Raport stiintific sintetic pentru intregul proiect

2016

Raport stiintific sintetic pentru intregul proiect cuprinde toate etapele parcurse in cadrul proiectului pana la prezenta raportare si descrie activitatiile desfasurate in etapa I (anul 2013), etapa II (anul 2014), etapa III (anul 2015) si etapa IV (anul 2016).

Etapa I

I. In cadrul etapei I a proiectului cu titlul „A new anti-invasive experimental strategy for infiltrative malignant gliomas", cod proiect PN-II-RU-TE-2012-3-0235, au fost indeplinite urmatoarele obiective propuse in planul de realizare al proiectului:

1. Evaluarea expresiei genelor implicate in invazia glioamelor in probele de glioblastom si in culturile primare de glioblastom, prin analiza qPCR

2. Evaluarea expresiei genelor implicate in invazia glioamelor in liniile de glioblastom prin analiza qPCR

3. Dezvoltarea unui nou model experimental de invazie in glioblastom: model tip „organotypic brain slices"

In vederea realizarii acestor obiective s-au desfasurat urmatoarele activitati:

A. Recoltarea probelor de glioblastom prin procedura chirurgicala clasica, "open surgery" (Activ. 1.1) si procedura biopsiei stereotactice (Activ. 3.1)

B. Obtinerea culturilor primare de glioblastom si achizitionarea liniilor de glioblastom (Activ.1.2 si Activ.2.1)

C. Extractia ARN si depozitare in biobanca (Activ. 1.3 si Activ. 2.2)

D. Analiza qPCR a genelor implicate in invazia glioamelor (Activ. 1.4 si Activ. 2.3)

E. Prelucrarea probelor tisulare extrase, cultivarea lor dupa modelul „organotypic brain slices" si evaluarea viabilitatii lor in cultura (Activ. 3.2)

A. Recoltarea probelor tumorale

Recoltarea probelor de glioblastom utilizate in proiect s-au realizat fie prin procedura clasica neurochirurgicala ("open surgery") fie prin procedura biopsiei stereotactice. S-au obtinut fragmente tumorale extrase conform protocolului standard chirurgical, proba tumorala fiind selectata din cadrul fragmentelor destinate analizei anatomo-patologice. Astfel prelevarea probelor tumorale incluse in

prezentul studiu nu a influentat in niciun fel tehnica chirurgicala sau gradul rezectiei in cazul tehnicii "open surgery", respectiv nu a prelungit timpul de desfasurare al procedurii bioptice stereotactice. Recoltarea probelor s-a facut in conditii de deplina siguranta pentru pacient si s-a efectuat cu consimtamantul scris al pacientului si al apartinatorilor (Fig.1).

SPITALUL CLINIC DE URGENTA BAGDASAR-ARSENI
Sos.Berceni, nr.12, sector 4, cod 041915
tel.: 334.30.54 centrala:334.30.25-27 fax: 334.73.50
e-mail: directie@bagdasar-arseni.ro, rsn@bagdasar-arseni.ro

Consimţământ informat pentru inrolarea in studiul:
„A new anti-invasive experimental strategy for infiltrative malignant gliomas"

Stimata doamna/Stimate domn,

Sunteţi invitat(ă) să participaţi într-un studiu despre modificările genetice în tumorile cerebrale. Scopul studiului nostru este de a identifica mecanismele moleculare implicate in invazia glioamelor cerebrale, pentru imbunatatirea diagnosticului si terapiei.
Participarea dumneavoastra este voluntara.

PROCEDURĂ: Veţi fi rugat(ă) să oferiţi o probă de tesut tumoral in timpul operatiei.
In timpul operatiei, o mica portiune din tesutul operat va fi prelevat in vederea extractiei de acizi nucleici si proteine pentru identificarea unor markeri specifici tumorilor cerebrale.
Dorim ca după încheierea studiului de faţă să păstrăm eventualul rest din proba ADN/ARN/proteica obţinută. Aceasta va fi congelată şi depozitată sub un cod şi nu direct cu numele dumneavoastră.
În cazul în care doriţi, vă puteţi retrage oricând din studiu, fără ca aceasta să afecteze în vreun fel dreptul dumneavoastră la tratament, inclusiv după ce aţi semnat acest formular.
Rezultatele studiului pe proba dumneavoastră sunt confidenţiale şi vor fi folosite numai în scop de cercetare.

BENEFICII ale participării:
- Ajuta la imbunatatirea protocolului de diagnostic
- Ajuta la dezvoltarea de noi terapii

RISCURI:
- Nu sunt riscuri suplimentare fata de cele asumate in consimtamantul operator

PLĂŢI ŞI ALTE BENEFICII:
- Nu veţi beneficia terapeutic din acest studiu, deoarece în acesta nu se administrează niciun medicament
- Nu veţi fi plătit(ă) ca să participaţi la acest studiu

CONFIDENŢIALITATE ŞI STATUT
Doar cercetătorii implicati in proiect şi un reprezentant al Comitetului de Etică al Spitalului vor avea acces la datele adunate pe parcursul acestui studiu. Utilizarea unor informaţii de tip personal este securizată conform legislaţiei în vigoare.
Deoarece informaţiile despre dumneavoastră şi despre starea dumneavoastră de sănătate sunt personale şi private, ele nu pot fi folosite în scop de cercetare fără acordul scris al dumneavoastră. Semnând acest formular, ne veţi da acordul dumneavoastră în acest sens.
Acest formular are scopul de a vă informa asupra felului în care datele despre sănătatea dumneavoastră vor fi folosite în acest studiu. Vă rugăm să citiţi cu atenţie înainte să semnaţi.

DATE DE CONTACT

Dacă aveţi întrebări legate de studiu sau dacă apar probleme, puteţi contacta persoana responsabila de studiu:

Dr. Felix Mircea Brehar, Spitalul Clinic de Urgenta „Bagdasar-Arseni", cu sediul în Bucuresti, cod poştal 041915, str. Soseaua Berceni nr. 10-12, judeţ (sector) 4, tel. 0213343025/int. 1707, mobil: 0724257549, fax 0213347350.

2

Declaraţia pacientului

(Incercuiti raspunsul corect)

Sunt / nu sunt de acord ca probele mele biologice să fie folosite in cercetări ulterioare

Sunt / Nu sunt de acord cu testul/testele descrise în acest formular.

- Sunt de acord ca probele sa fi depozitate în Laboratorul de Cercetare al spitalului pentru uz ulterior.
- Înţeleg faptul că proba ar putea fi trimisă spre un alt laborator în afara Spitalului Clinic de Urgenta „Bagdasar-Arseni".

Semnătura pacientului .... Data..............................

Nume (Litere de tipar) ....CNP..............................

Semnătură apartinator ruda gradul I.. Dată ....

Nume (Litere de tipar) ....

Note importante: (bifaţi dacă este cazul)

- **Pacientul şi-a retras consimţământul (rugaţi pacientul să semneze aici) ....**
Data:......................

Declaraţia personalului medical

Am explicat procedura pacientului. În mod particular i-am explicat beneficiile şi riscurile aşa cum apar în acest formular.
Am discutat de asemenea ce ar putea implica procedura, beneficiile şi riscurile oricărei testări alternative (inclusiv lipsa unei testări) şi orice problemă care preocupă pacientul.

Semnătura:...................................... Data ....

Nume (Litere de tipar) ....

Statut (investigator / medic curant) ....

Fig. 1 - Modelul consimtamantului scris completat de pacientii si apartinatorii implicati in prezentul studiu

Au fost inclusi in prezentul studiu pacienti cu glioame cerebrale gradul II, III si IV (glioblastom) confirmate la examinarea histo-patologica standard (probe parafinate colorate cu hematoxilin eozin) ± examinare imunohistochimica. Motivul pentru care glioamele cerebrale grad I nu au fost incluse in studiu este faptul ca acest tip de tumori au anumite particularitati histo-patologice distincte fata de celelalte grade (cum ar fi astrocitomul pilocitic) si in plus sunt bine circumscrise si nu au tendinta la invazie (1, 2).

a. Recoltarea probelor prin tehnica neurochirurgicala clasica "open surgery"

Tehnica neurochirurgicala de exereza a tumorii a fost selectata pentru tumorile bine delimitate, localizate in zone cerebrale neelocvente, accesibile chirurgical si cu un efect de masa important asupra structurilor cerebrale (Fig. 2), la care pe primul plan era reducerea efectului de masa si la care se putea anticipa o rezectie tumorala cat mai larga fara risc major de aparitie a defictelor neurologice postoperatorii.

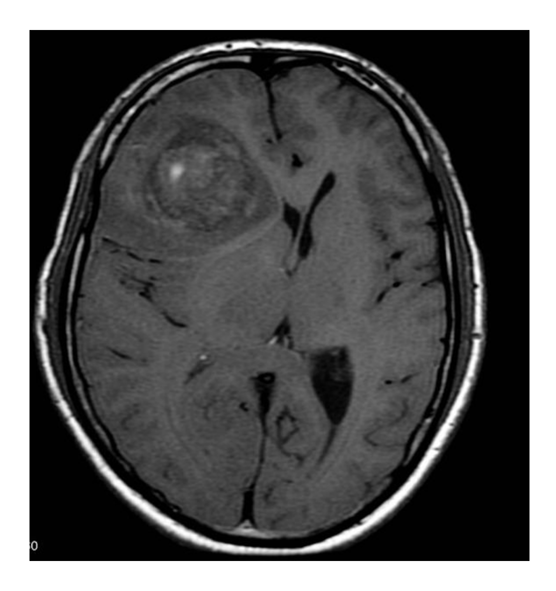


Fig.2. Glioblastom frontal drept (gliom grad IV). Tumora relativ bine delimitata, localizata frontal dreapta (emisfer cerebral non-dominant) cu efect de masa. Pacient cu indicatie de "open surgery"

Etapele operatorii sunt urmatoarele:

- anestezierea pacientului (anestezie generala cu intubatie oro-traheala)

- pozitionarea si pregatirea campului operator (Fig. 3a)

- craniotomia

- deschiderea durei mater si expunerea ariei cerebrale infiltrate tumoral care apare edematiata, cu desen vascular modificat (Fig. 3b)

- exereza tumorala

- hemostaza

- inchiderea planurilor

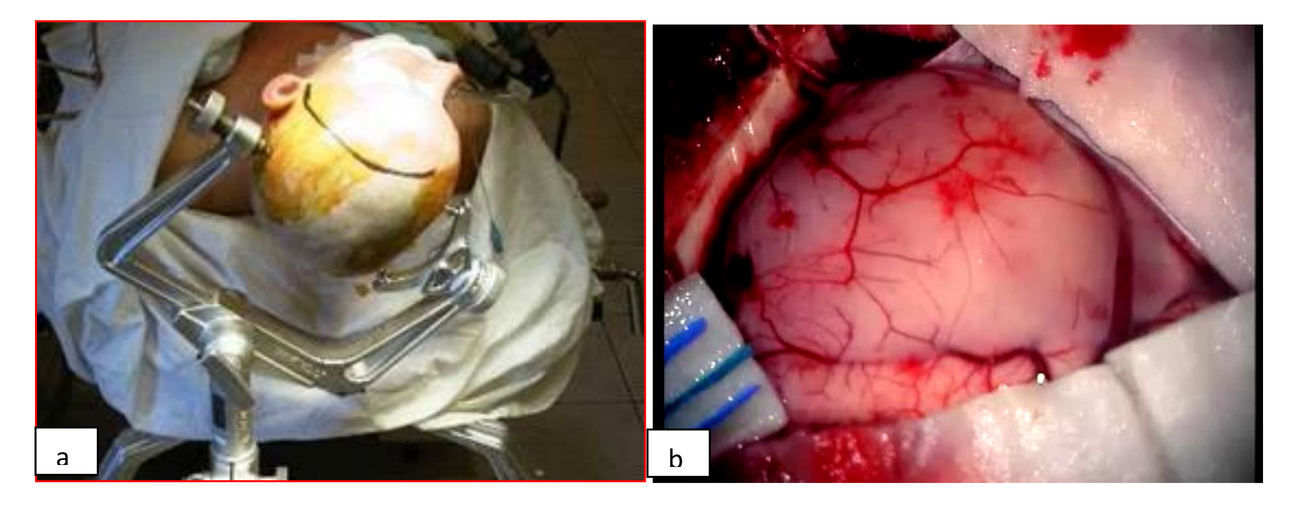


Fig. 3. Etapele operatorii ale interventiei neurochirurgicale "open surgery"- Sp. Cl "Bagdasar-Arseni"

b. Recoltarea probelor prin tehnica biopsiei stereotactice

Pacientii selectati pentru biopsia stereotactica au prezentat glioame cerebrale infiltrative (Fig. 4a), localizate profund sau in arii elocvente (Fig. 4b), la care nu se putea realiza o exereza tumorala semnificativa sau la care exereza tumorala ar fi fost insotita de un risc major de deficit neurologic postoperator.

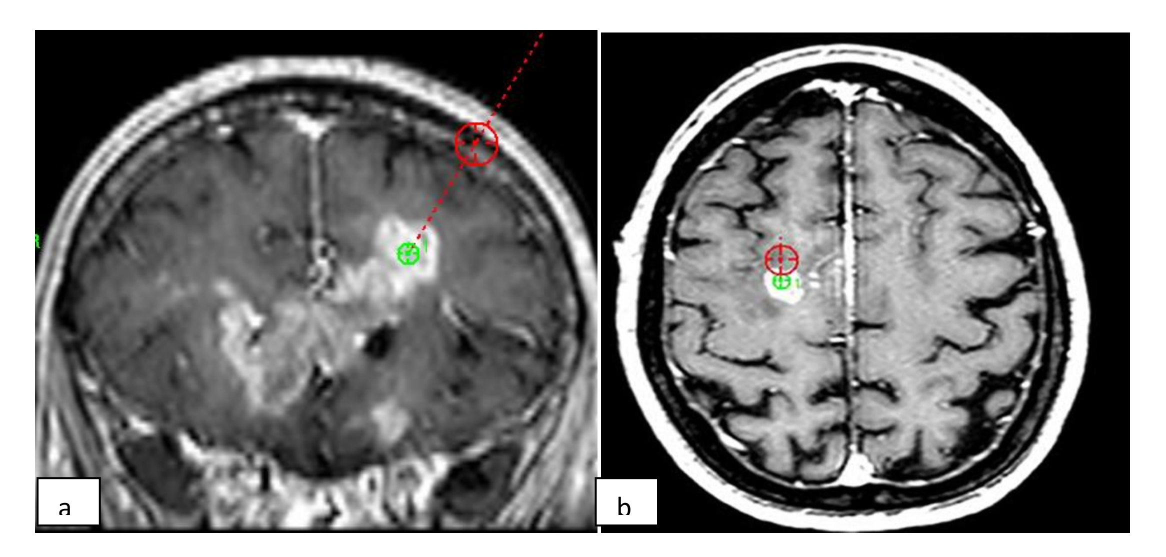


Fig.4. Tipuri de glioame cerebrale selectate pentru procedura de biopsie stereotactica (Imagini RMN cerebral secventa T1 cu contrast tip snapshot selectate in timpul planningului preoperator) - Sp. Cl "Bagdasar-Arseni"

Toate procedurile stereotactice au fost realizate de catre Dr. Felix Brehar, utilizandu-se sistemul Leksell stereotactic system (Fig.5) si softul Stereotactic Planning System (SPS) software, versiunea NTPS 8.2 (Elekta, Suedia). Pentru scanarea pacientului s-a utilizat RMN tip 1,5 Tesla Magnetic Resonance (MRI) (Philips Integra). Sistemul utilizat de autor pentru realizarea procedurii este unul dintre cele mai exacte (eroare medie sub 0,5 mm si maxima sub 1 mm). Acul de biopsie utilizat a fost Sedan type I (Elekta, Suedia) cu o fanta de sectiune de 10 mm. Etapele biopsiei stereotactice sunt:

- fixarea cadrului stereotactic

- scanarea CT sau RMN cerebral

- planningul procedurii

- biopsia stereotactica (Fig. 6)



Fig. 5. Sistemul stereotactic Leksell



Fig. 6. Aspect intraoperator surprins in timpul unei proceduri bioptice cerebrale stereotactice - Sp. Cl "Bagdasar-Arseni"

Probele tumorale selectate intraoperator pentru a fi incluse in studiu, au avut dimensiuni de sub 1 cm, au fost curatate de sange si detritusuri celulare si au fost incluse in contitii sterile intr-un tub ependorf de 1,5 ml umplut cu solutie RNA saver si au fost imediat pastrate la 2-4 grade C 24 ore si apoi la -80 grade pana la extractia ARN.

Pana la momentul raportarii au fost inclusi in studiu 30 de pacienti cu glioame cerebrale din care la 15 pacienti s-au recoltat probe tumorale prin tehnica chirurgicala standard tip "open surgery" si la 15 s-a practicat biopsia stereotactica. La 11 pacienti la care tumora era localizata in arii neelocvente la nivelul polului frontal si temporal s-a realizat procedura standard de rezectie de pol frontal respectiv pol temporal. In aceste cazuri s-a realizat o ablatie tumorala totala si s-a reusit prelevarea de fragmente tisulare din tesutul cerebral peritumoral in conditii de siguranta pentru pacient. Aceste probe au fost utilizate ca probe martor. A fost realizata extractia ARN la 21 de cazuri din cele 30, in total fiind luate in lucru pana la momentul raportarii 31 de probe (21 probe tumorale si 10 probe peritumorale).

B. Obtinerea culturilor primare de glioblastom si achizitionarea liniilor de glioblastom

In doua cazuri de pacienti cu tumori voluminoase (Pacientul 15 si pacientul 16) la care s-a practicat interventia neurochirurgicala deschisa s-au putut preleva mai multe fragmente tumorale din care s-au initiat culturi primare de glioblastom.

Deosebit de important este timpul de mentinere a fragmentelor in ser fiziologic sau mediu de cultura, pana la prelucrare. Prelucrarea fragmentelor tumorale se face in aceeasi zi, la cel mult 2-3 ore de la prelevarea intraoperatorie. Daca timpul de prezervare a fragmentelor de tesut tumoral depaseste cateva ore, este de asteptat ca intratumoral sa se induca si sa se intretina reactii enzimatice extra si intracelulare, cu suferinta celulara, modificarea proprietatilor celulelor tumorale, scaderea viabilitatii prin sensibilizarea membranara

la actiunea sistemelor enzimatice, scaderea ratei de adeziune postcrioconservare, pana la distructie celulara masiva prin liza osmotic, enzimatica, etc.

Prelucrarea fragmentelor se realizeaza in conditii de perfecta sterilitate, la hota de lucru.

Inainte de prelucrarea mecanica, fragmentele tumorale sunt spalate de 3 ori cu ser fiziologic sau PBS (solutie tampon fosfat – phosphate buffer solution), pentru indepartarea urmelor de sange si a detritusurilor celulare.



Fig. 7. Prelucrarea mecanica a fragmentului tumoral in hota de lucru

Prelucrarea si selectia grupurilor celulare elocvente se realizeaza cu instrumentar fin, extrem de ascutit, steril, de tip instrumentar microchirurgical, intr-o cutie Petri de dimensiuni medii. Este extrem de important recunoasterea macroscopica a partilor tumorale relevante, inlaturarea cu ajutorul lamei de bisturiu a partilor necrozate, a portiunilor coagulate de catre chirurg, a vaselor de sange cerebrale sau a celor de neoformatie tumorala precum si a cheagurilor aferente, a zonelor fibroase de tip capsula tumorala, sau a portiunilor de glioza cerebrala, de creier normal peritumoral, a fragmentelor de tesut gras, muscular, etc. Partile de tesut tumoral relevante sunt de culoare brun-cenusiu-rosiatica, si recunoasterea lor este posibila numai prin experienta, in exereze tumorale multiple. Dupa eliminarea portiunilor tisulare irelevante ale fragmentului recoltat, fragmentele tumoral restante se sectioneaza in mod repetat cu bisturiul, pana la fragmente cu dimensiuni milimetrice.

Autorii au initiat o metodologie proprie de generare si mentinere a culturilor celulare primare derivate din tumori cerebrale pe baza protocoalelor existente in literatura de specialitate, modificate si adaptate in functie de rezultatele obtinute experimental (3).

Etapele initierii culturiilor primare de glioblastom au fost:

1. Dispersia enzimatica si mecanica a fragmentelor tisulare
2. Suspendarea in mediu de cultura DMEM cu 20% ser fetal
3. Subculturi seriate la confluenta 85-90%

Mediile utilizate: DMEM (Dulbecco Modified Essential Medium) + 3% Penicilina si Streptomicina + 20% ser fetal, Ser fetal , PBS (phosphate buffered saline solution - solutie salina tamponata)- 0,01M, Tripsina 1:250, glucoza 1%.

Dispersia tisulara s-a dovedit a fi mai eficienta si mai rapida cand s-a utilizat solutia de tripsina comparativ cu EDTA, in schimb, aderarea celulara si formarea monostratului s-au produs mult mai lent in cazul dispersiei enzimatice. In consecinta, dispersia fragmentelor prin utilizarea tripsinei asociata cu EDTA, desi

este mai lenta, protejeaza celulele si favorizeaza aderarea si etalarea acestora. Timpul de dispersie se mentine la 2 – 3 minute; peste 5 – 8 minute este afectata integritatea membranei si / sau a receptorilor de membrana, iar celulele nu adera. EDTA in concentratie optima de 20mM actioneaza ca agent chelator de Ca+2 (Ca+2 intervine in adeziunea intercelulara). Glucoza 1% in solutia de tripsina asigura un procent mai mare de celule viabile si o osmolaritate adecvata.
De asemenea, experimental s-a observat ca inactivarea tripsinei este mai eficienta daca se realizeaza prin adaugarea de ser fetal comparativ cu inactivarea pe gheata.
S-au cultivat culturile primare pentru 20 de pasaje, urmarindu-se aspectul fenotipic (Fig. 8).

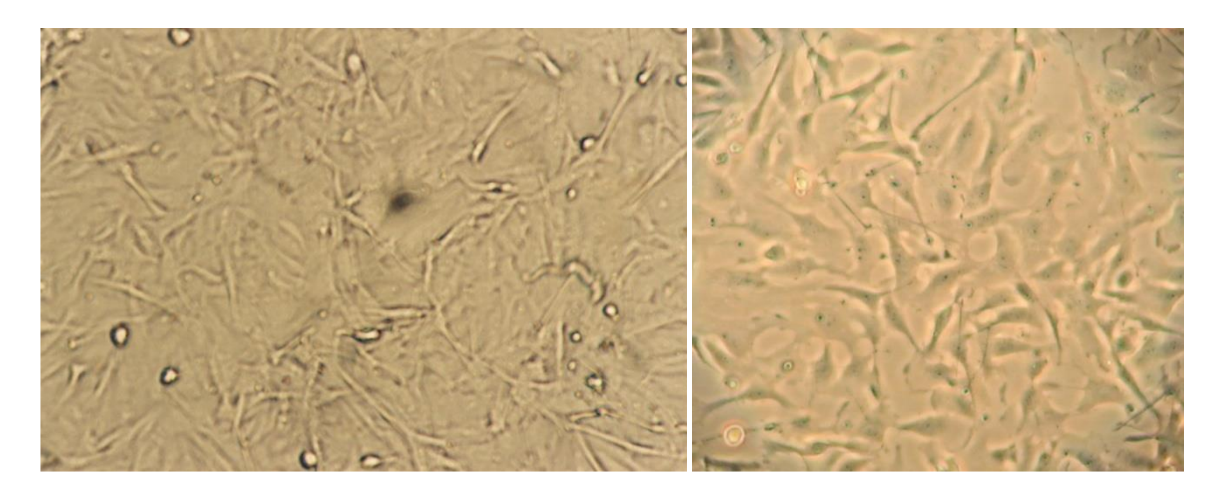


Fig. 8. Aspect microscopic (microscop Zeiss Axiovert 25C) al culturilor primare de glioblastom la pasajul 10 (a) respectiv 20 (b).

In cadrul proiectului a fost achizitionata linia de glioblastom U-251 MG (denumita initial U-373 MG) de la European Collection of Cell Cultures (ECACC). Aceasta este una dintre cele vechi si mai utilizate linii de glioblastom si este foarte utila in cadrul proiectului intrucat asigura o reproductibilitate inalta a experimentelor si a rezultatelor obtinute (4). Aceasta linie a fost livrata sub forma congelata in criotuburi. Pentru revitalizarea sa s-a utilizat protocolul uzual de revitalizare si s-au utilizat urmatorii reactivi: minimum essential medium (MEM), solutie aminoacizi non-essential, solutie piruvat, ser fetal, solutie antibiotic, solutie glutamina. Linia U251 se paseaza la o confluenta celulara de 60-70%. Aspectul fenotipic este ilustrat in Fig.9

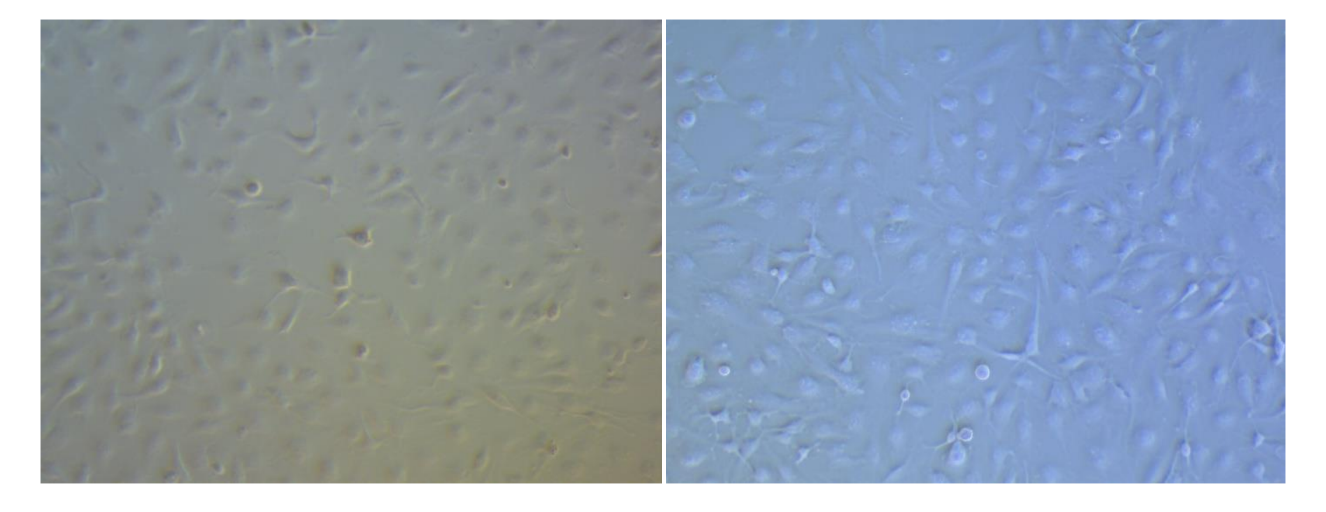


Fig.9. Aspectul liniei de glioblastom U251 in cultura.

C. Extractia ARN si depozitare in biobanca

Probele au fost prelevate de la pacienti, spalate cu tampon fosfatsalin si stocate in RNASave. ARN total a fost izolat cu ajutorul kitului Maxwell® 16 LEV simply RNA si a aparatului Maxwell 16 (Promega). In vederea izolarii RNA, probele au fost fragmentate mecanic si omogenizate in tamponul de omogenizare din kitul Maxwell® 16 LEV simplyRNA, cu ajutorul unor bile de zirconiu de 0.5mm diametru (c.a. 200mg). Omogenizarea s-a realizat in 2 cicluri a cate 30 sec, separate de 1 ciclu de racire de 30 secunde, utilizand aparatul Speed Mill (Analytik-Jena, Germania). Dupa centrifugarea probelor 1 min 5000g, s-au prelevat 200 μl supernatant care a fost amestecat cu 200μl tampon de liza, vortexat puternic 15 sec si introdus in cartusul aparatului Maxwell 16, unde a avut loc izolareaARN. Concentratia probelor de ARN a fost evaluata prin citirea densitatii optice la 260nm la spectrofotometrul Nanodrop. Calitatea ARN izolat a fost evaluata prin determinarea raportului DO260/DO280. Toate probele au avut rapoarte cuprinse intre 1.8-2, ceea ce indica o puritate foarte buna a ARN izolat din tesut. Au fost obtinute intre 0.800μg si 37μg RNA per proba. Pentru reverstranscriere si qPCR s-au utilizat 500ng RNA pentru fiecare proba. Excesul de ARN a fost depozitat in biobanka la -80 grd C pentru experimente ulterioare.

D. Analiza qPCR a genelor implicate in invazia glioamelor

In cadrul proiectului a fost analizata expresia in tesutul tumoral a urmatoarelor gene implicate in invazia glioamelor: PAFAH1B1 (LIS1), NDEL1, CDK5, MYH9, TWIST1, SNAI2. Genele LIS1, NDEL1 si CDK5 sunt componenta a caii pro-neurale (mecanism molecular similar cu cel folosit de celulele precursoare neurale bipolare migratorii in timpul ontogenezei cerebrale) (5,6), in timp ce genele TWIST1 si SNAI2 sunt parte a componentei pro-mezenchimale (mecanism molecular utilizat si de alte tipuri de tumori in timpul metastazarii) (7,8). MYH9 (miozina II) este un motor molecular important dovedit a fi implicat in migrarea celulelor tumorale gliale (5,6). Ca expresie de referinta au fost folosite doua gene *house-keeping* Actina B (ACTB) si GAPDH.

Reverstranscrierea ARN in cDNA a fost realizata folosind MMLV si oligod (Invitrogen) si 500ng RNA, intr-un volum final de 50 μl.
Analiza Real Time PCR a fost realizata folosind TaqMan® Gene Expression Assays (Invitrogen) pentru urmatoarele gene:
- PAFAH1B1 (Assay ID: Hs00181182_m1),
- CDK5(Assay ID: Hs00358991_g1)
- MYH9 (Assay ID: Hs00159522_m1)
- TWIST1 (Assay ID: Hs01675818_s1
- SNAI2 (Assay ID: Hs00950344_m1)
- NDEL1 (Assay ID: Hs01092624_m1)

Toate sondele pentru genele de interes de mai sus au fost marcate cu FAM.
Pentru normalizarea rezultatelor, a fost analizata si expresia genelor GAPDH si actina, ale caror sonde au fost marcate cu VIC.
Amestecul de reactie a continut 1 μl cDNA, 5μl TaqMan® Universal Master Mix II, cu UNG (concentrate x2, Invitrogen), 1 μl primeri si sonda si 3μl apa. Pipetarea probelor in placa cu 384 godeuri s-a efectuat cu ajutorul pipetorului automat Qiagility (Qiagen), folosind varfuri conductive de 50μl.

Programul de amplificare a fost urmatorul: 2min, 50°C; 10 min, 95°C; urmat de 40 cicluri: 15 sec, 95°C si 1min ,60°C si a fost realizat in aparatul7900HT System de la Applied Biosystem.

Rezultatele obtinute in programul SDS2.4, au fost prelucrate folosind un Software de analiza RQ Manager.

Valoarea expresiei genelor urmarite in probele tumorale si peritumorale (normal) este ilustrata in tabelul 1

proba	nr. pac.	Assay	CDK5	MYH9	NDEL1	PAFAH1B1	SNAI2	TWIST1	ACTB vic	GAPDH vic
normal	1	1 (RQ)	0,9714	4,9686	1,867	2,251	1,2173	9,9229	1,4379	0,6955
normal	3	4 (RQ)	0,9471	1,9536	0,9278	1,5451	1,1274	0,1206	0,8542	1,1707
normal	4	6 (RQ)	1,2088	0,163	0,8194	1,5359	1,6445	0,351	1,2206	0,8193
normal	7	10 (RQ)	1	1	1	1	1	1	1	1
normal	8	12 (RQ)	0,6236	3,2145	3,475	3,0225	1,5478	0,3872	1,1074	0,903
normal	10	15 (RQ)	1,4261	2,0422	0,636	1,0868	2,5491	156,1858	0,9353	1,0692
normal	13	19 (RQ)	4,25	3,5051	2,1324	3,3684	0,7871	12,4159	0,9345	1,0701
normal	19	26 (RQ)	3,2193	3,1348	1,5566	1,8181	1,4803	1,7799	0,9797	1,0207
normal	20	28 (RQ)	0,822	1,983	1,0389	0,5797	1,3632	1061,1481	0,5873	1,7027
normal	21	30 (RQ)	0,8343	0,872	0,9905	1,2614	0,6833	1,0912	0,7298	1,3703
tumora	1	2 (RQ)	0,593	2,2895	0,3814	0,1078	2,8505	370,6255	0,4495	2,2246
tumora	3	5 (RQ)	1,3599	0,6167	0,3603	0,6792	1,3771	145,1248	0,6365	1,5711
tumora	4	7 (RQ)	2,2943	1,8173	0,9126	0,9301	3,2428	5,2325	1,1277	0,8868
tumora	7	11 (RQ)	1,9776	3,397	0,5937	0,5791	2,7548	0,067	0,5612	1,7819
tumora	8	13 (RQ)	1,6677	4,168	0,9616	0,8178	0,4639	24,3219	0,8966	1,1153
tumora	10	16 (RQ)	0,2629	3,7631	1,083	2,4531	6,457	246,7301	1,0814	0,9248
tumora	13	20 (RQ)	0,7655	1,022	0,9997	0,7724	1,3143	6,6413	1,1229	0,8905
tumora	19	27 (RQ)	1,2173	0,7826	0,4704	0,9973	3,3011	34,1066	0,4203	2,3793
tumora	20	29 (RQ)	0,9382	2,2798	1,0087	0,8262	1,5112	1107,3166	0,7897	1,2663
tumora	21	31 (RQ)	0,7491	3,8306	0,696	0,6982	2,5612	41,4521	0,8546	1,1701
tumora	9	14 (RQ)	0,8238	1,2496	1,0989	0,5959	3,0797	0,2886	0,573	1,7452
tumora	24	17 (RQ)	1,5311	0,7033	0,7352	0,566	3,5391	463,5058	0,509	1,9647
tumora	25	18 (RQ)	1,843	1,295	0,8638	0,8936	2,8642	14,3021	0,5292	1,8896
tumora	14	21 (RQ)	1,1479	1,3218	0,4402	0,7901		0,1735	0,5098	1,9617
tumora	15	22 (RQ)	0,6088	0,4047	0,4127	0,2448	2,6895	0,0735	0,4612	2,1683
tumora	16	23 (RQ)	1,7441	0,6171	0,7332	1,9885	3,5162	106,554	0,5555	1,8001
tumora	17	24 (RQ)	2,5625	0,7935	1,34	2,2342	0,7049	0,1133	0,4568	2,1894
tumora	18	25 (RQ)	1,6222	1,5868	0,8481	1,1109	0,8291	59,7247	0,6923	1,4444
tumora	2	3 (RQ)	1,8719	1,9149	1,0235	0,6593	0,5884	0,1668	0,6758	1,4797
tumora	5	8 (RQ)	4,0557	0,8265	4,1002	4,1463	7,2411	11,1016	3,1359	0,3189
tumora	6	9 (RQ)	0,1424	1,4381	0,5613	0,1722	1,2184	605,4901	0,5438	1,8388

Tabel 1. Expresia genelor urmarite in probele tumorale si peritumorale (normal) la pacientii luati in studiu

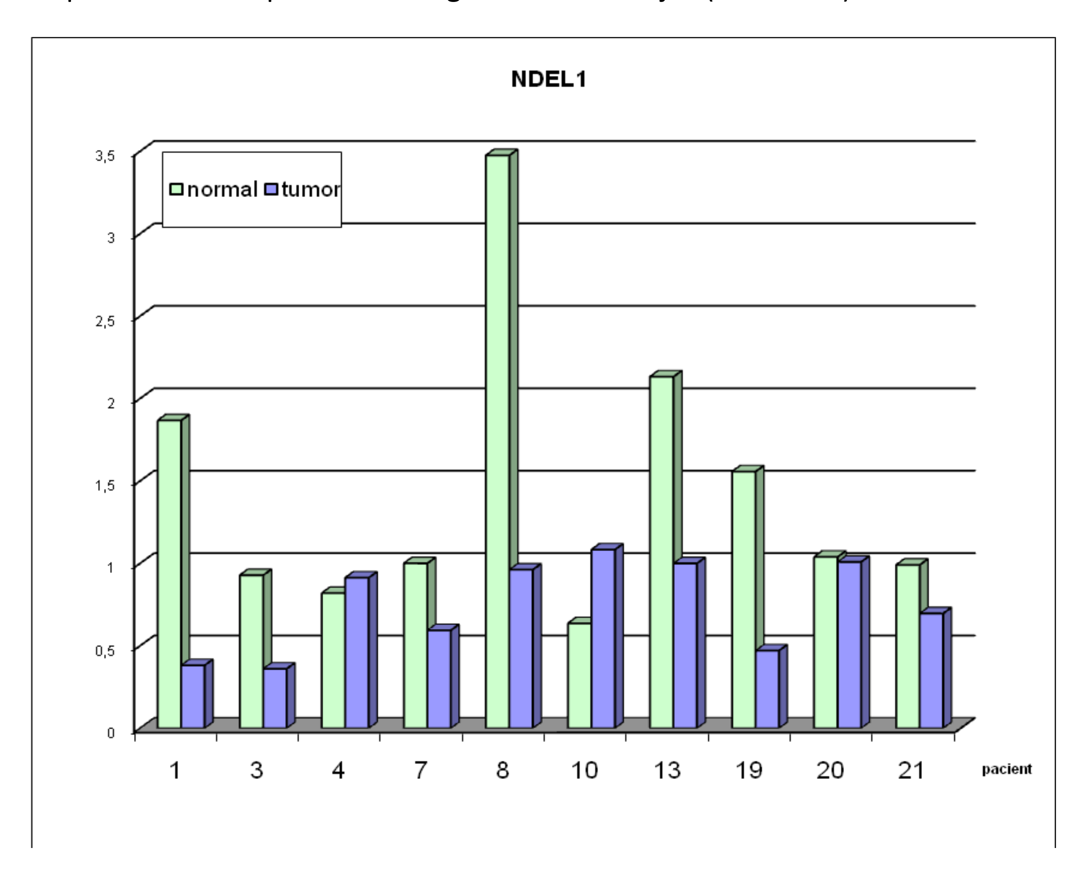
Din analiza tabelului 1 se pot observa valori foarte crescute in anumite probe atat tumorale cat si peritumorale (normale) pentru gena TWIST fapt ce face dificil de interpretat rezultatele obtinute pentru aceasta gena. Compararea expresiei genelor intre probele tumorale si normale pentru cei 10 pacienti la care s-au putut obine ambele tipuri de probe este ilustrata in urmatorul tabel (Table 2)

Nr. pacient	**CDK5**	**MYH9**	**NDEL1**	**PAFAH1B1**	**SNAI2**
1	**0,61**	**0,46**	**0,20**	**0,05**	**2,34**
3	**1,44**	**0,32**	**0,39**	**0,44**	**1,22**
4	**1,90**	**11,15**	**1,11**	**0,61**	**1,97**
7	**1,98**	**3,40**	**0,59**	**0,58**	**2,75**
8	**2,67**	**1,30**	**0,28**	**0,27**	**0,30**
10	**0,18**	**1,84**	**1,70**	**2,26**	**2,53**
13	**0,18**	**0,29**	**0,47**	**0,23**	**1,67**

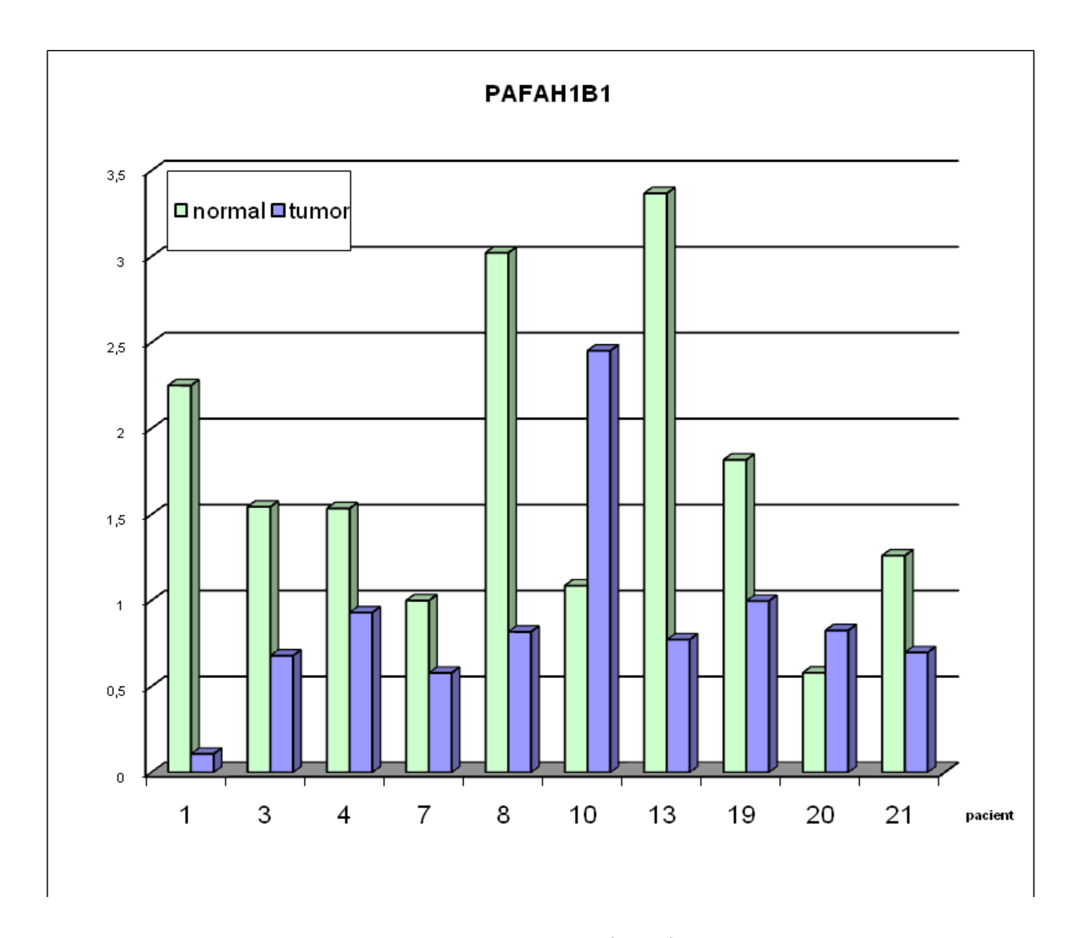
19	0,38	0,25	0,30	0,55	2,23
20	1,14	1,15	0,97	1,43	1,11
21	0,90	4,39	0,70	0,55	3,75

Tabel 2. Analiza expresiei genelor tinta in tesutul tumoral comparativ cu tesutul peritumoral. Cu rosu sunt trecute valorile crescute

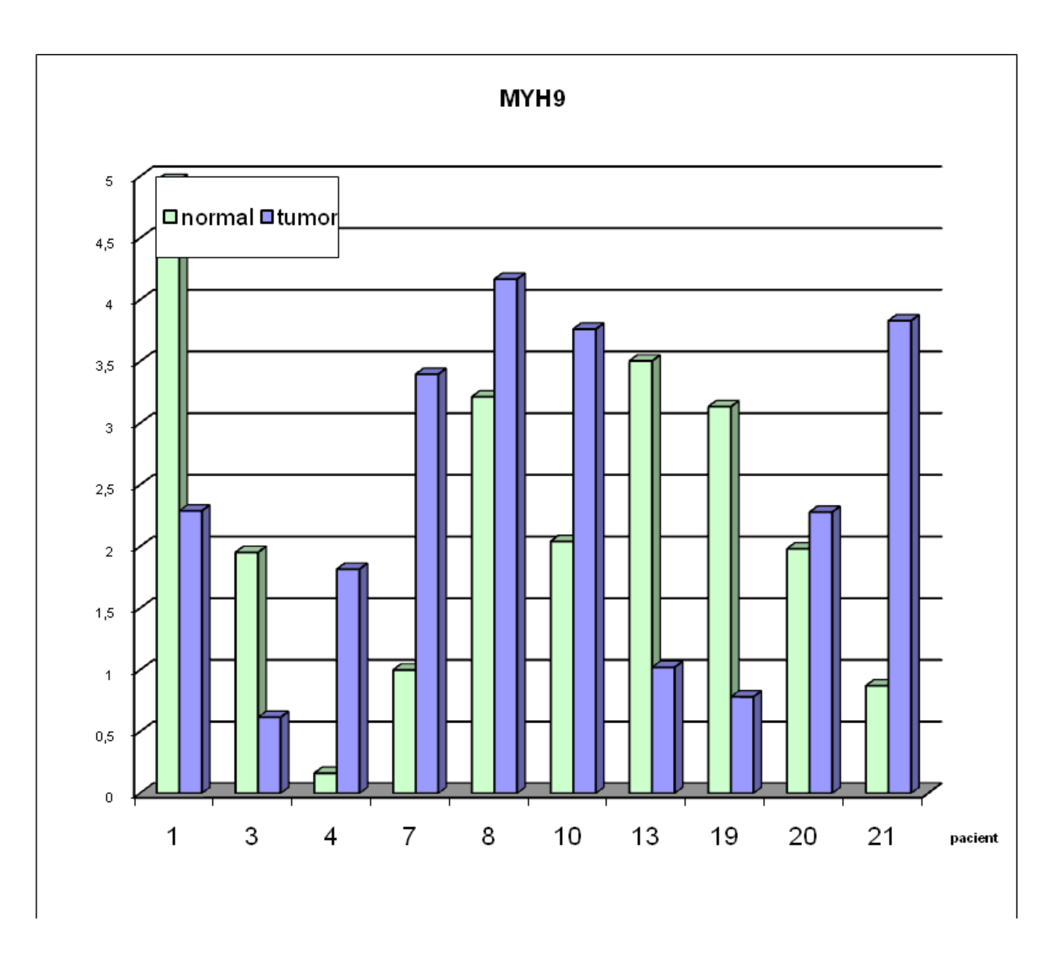
Reprezentarea grafica a expresiei genelor tinta in tesutul tumoral comparativ cu cel peritumoral pentru cei 10 pacienti este reprezentata in graficele de mai jos (Grafic 1-5)



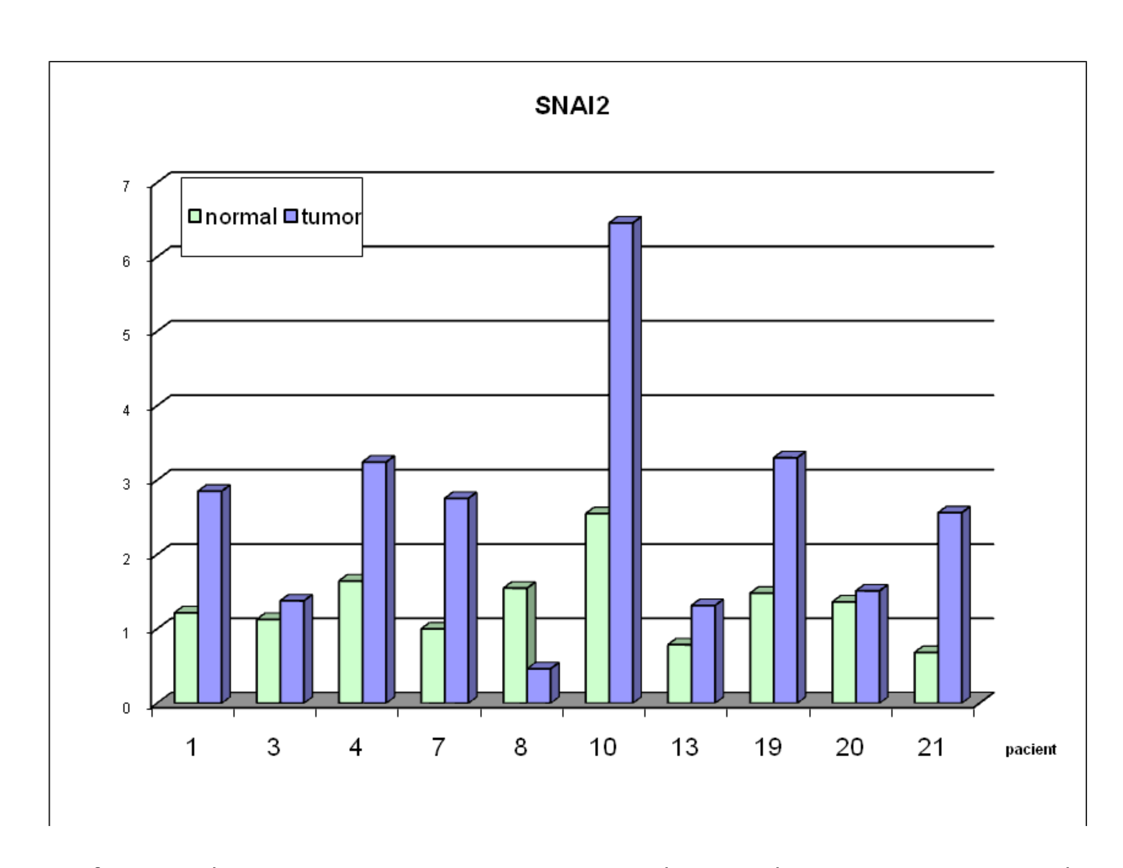
Grafic 1. Analiza expresiei genei NDEL1 in tesutul tumoral comparativ cu tesutul peritumoral



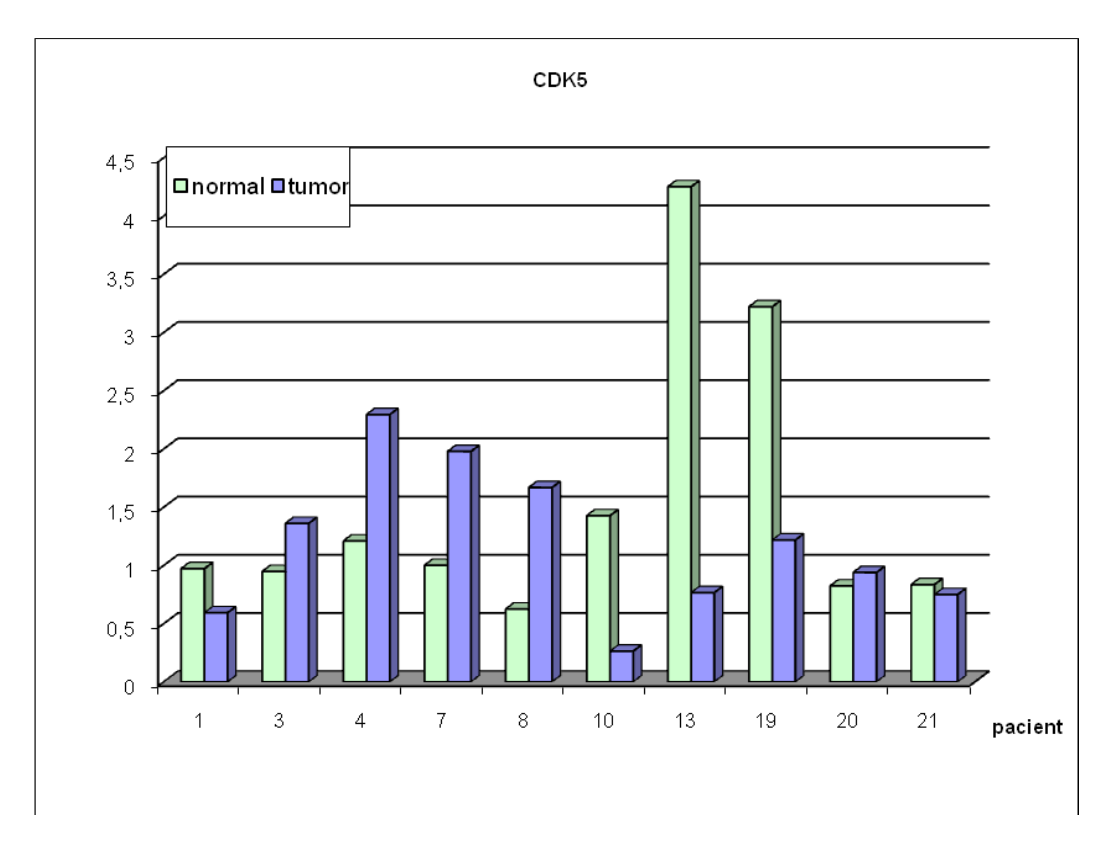
Grafic 2. Analiza expresiei genei PAFAH1B1 (LIS1) in tesutul tumoral comparativ cu tesutul peritumoral



Grafic 3. Analiza expresiei genei MYH9 (miozina II) in tesutul tumoral comparativ cu tesutul peritumoral



Grafic 4. Analiza expresiei genei SNAI2 in tesutul tumoral comparativ cu tesutul peritumoral



Grafic 5. Analiza expresiei genei CDK5 in tesutul tumoral comparativ cu tesutul peritumoral

Din analiza expresiei genelor tinta in cele 10 cazuri la care s-a reusit recoltarea atat a probelor tumorale cat si a celor peritumorale (normale), se remarca gena SNAI2 care prezinta o activitate constant crescuta in toate probele tumorale cu exceptia cazului nr. 8 (grafic 4). Gena MYH9 prezinta o activitate crescuta in 6 din cele 10 cazuri, gena CDK5 in 5 din 10 iar genele LIS si NDEL1 doar in 2 din 10 cazuri.

Comparand media expresiei genelor tinta (cu exceptia genei TWIST) in tesutul tumoral (21 probe) si cel peritumoral cerebral (10 probe) am obtinut urmatoarele rezultate (Tabel 3). Se observa o expresie crescuta pentru gena SNAI2 in probele tumorale (cu 95%) comparativ cu probele normale. Gena SNAI2 este implicata in mecanismul oncogenetic, in special in invazia si metastazarea carcinoamelor (9) si s-a demonstrat de asemenea expresia sa crescuta in glioamele maligne (10) precum si corelarea cu expresia TWIST (8). Gena SNAI2 ar putea reprezenta astfel o tinta moleculara in cadrul terapiei antiinvazive si va fi studiata in etapele urmatoare ale proiectului. Pentru gena TWIST se va repeta analiza qPCR.

Medie	CDK5	MYH9	NDEL1	PAFAH1B1 (LIS1)	SNAI2
N	1,52	2,28	1,44	1,74	1,33
T	1,42	1,71	0,93	1,05	**2,60**

Tabel 3: Media expresiei genelor tinta in probele tumorale(T) si peritumorale(N)

Expresia genelor implicate in calea pro-neurala este crescuta in tesutul cerebral comparativ cu tesutul tumoral. Pentru gena CDK5 acest rezultat a fost evidentiat si de alti autori care au observat ca nivelul CDK5 in glioblastom este mai mic (la o diferenta mica, nesemnificativa statistic) decat in tesutul cerebral dar este semnificativ mai mare comparativ cu celulele astrocitare. Acest lucru se datoreaza faptului ca nivelul CDK5 este in mod normal mai mare in neuroni comparativ cu astrocitele, astfel tinand cont de faptul ca celulele astrocitare sunt la originea glioamelor grad II-IV, se poate concluziona faptul ca nivelul CDK5 este de fapt supraexprimat in tesutul tumoral glial (11). Acest mecanism ar putea explica si rezultatele obtinute pentru celelalte gene implicate in calea pro-neurala (LIS1 si NDEL1) in care avem o expresie crescuta in tesutul cerebral comparativ cu cel tumoral.

E. Prelucrarea probelor tisulare extrase, cultivarea lor dupa modelul „organotypic brain slices" si evaluarea viabilitatii lor in cultura

Unul dintre modele experimentale folosite frecvent pentru studiul invaziei glioamelor este modelul *in tissue* (Organotypic Brain Slice Culture) de cultivare a sectiunilor tisulare cerebrale de soarece (12). Acest model nu reflecta insa suficient de corect realitatea biologica in situ. Astfel exista diferente notabile intre morfologia celulelor si caracteristicile tisulare ale creierului murin comparativ cu cel uman si, in plus, la periferia tumorii apar cateva fenomene cum ar fi edemul peritumoral si glioza peritumorala care influenteaza semnificativ migrarea celulelor tumorale. Astfel un element de noutate ale proiectului il reprezinta dezvoltarea unui nou model *in tissue* de studiu al invaziei in glioblastom. In acest scop s-au prelevat utilizandu-se tehnica biopsiei stereotactice fragmente tisulare ce includ portiune tumorala si zona tisulara peritumorala ce reprezinta zona de tranzitie intre tumora si tesutul cerebral foarte importanta din punct de vedere al invaziei glioamelor. Tinta initiala a fost localizata la nivelul periferiei zonei de hipersemnal in T1 cu contrast MR cerebral, pentru glioamele grad III si IV, respectiv periferia zonei de hipersemnal in secventa FLAIR pentru glioamele grad II. Intrucat acul utilizat pentru biopsie a fost de tip

Sedan cu o lungime a fantei de 10 mm, pe aceasi proba tisulara s-au putut identifica la examinarea anatomo-patologica atat tesut tumoral cat si tesut peritumoral cerebral (Fig. 10).

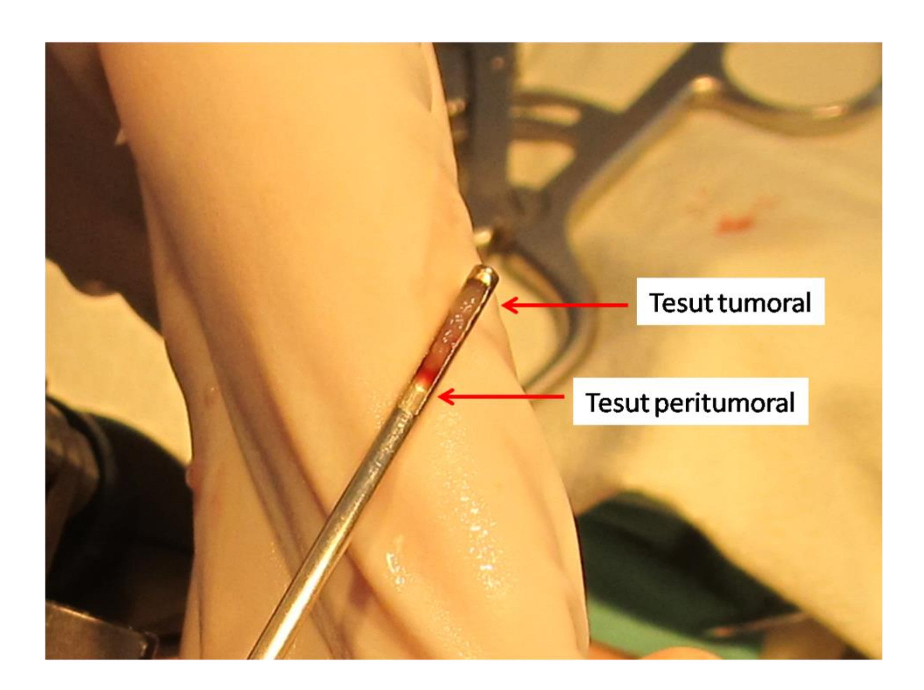


Fig. 10. Aspectul cilindrului tisular extras din periferia tumorala prin tehnica biopsiei stereotactice cu ajutorul acului de biopsie Sedan tip I. Pe aceasi sectiune se pot identifica macroscopic atat tesut tumoral cat si tesut peritumoral cerebral.

Zona tumorala era alcatuita aproape in totalitate de celule tumorale, in timp ce zona peritumorala continea neuropil cerebral infiltrat de celule tumorale.

Cilindrul tisular a fost sectionat utilizandu-se microtomul McIlwain Tissue Chopper in sectiuni tisulare de aproximativ 300-400 microni grosime. Sectiunile au fost cultivate pe placi de cultura special tratate pentru aderarea tesuturilor (culture plate inserts cu pori de 0.4 microni si diametru de 12 si de 30 mm), utilizandu-se mediu DMEM suplimentat cu glutamina ser fetal si solutie antibiotice la temperatura de 37 grade C si concentratie de CO_2 de 5%. Pe o perioada de 14 de zile s-a constat mentinerea viabilitatii sectiunilor tisulare, cu pastrarea arhitecturii tisulare. Studiul migrarii celulelor tumorale utilizand sectiunile tisulare extrase din zona periferica tumorala si cultivate *in vitro* va fi realizat in cadrul etapei cu numarul II a proiectului.

Etapa II

II. In cadrul etapei II a proiectului au fost indeplinite urmatoarele obiective si activitati propuse in planul de realizare al proiectului:

Obiectiv 1. Evaluarea eficientei unui nou model experimental de invazie in glioblastom: model tip „organotypic brain slices”:

Activitate 1.1. Inocularea liniilor si a culturilor primare de glioblastom la nivelul sectiunilor tisulare si monitorizarea migrarii celulelor tumorale prin microscopie in fluorescenta

Activitate 1.2. Evaluare eficientei noului model experimental de invazie comparativ cu modelele existente

Obiectiv 2. Blocarea genelor/moleculelor tinta implicate in invazia glioamelor – evaluare prin tehnica „scrape migration assay”:

Activitate 2.1. Blocarea genelor/moleculelor tinta in liniile de glioblastom si in culturile primare de glioblastom

Activitate 2.2. Evaluarea eficientei inhibarii migrarii prin tehnica „scrape migration assay” (migrare pe suprafata, in 2 dimensiuni)

In plus, fata de activitatile programate pentru etapa II a proiectului, s-au continuat derularea activitatilor din cadrul obiectivului 1 al etapei I, respectiv evaluarea expresiei genelor implicate in invazia glioamelor in probele de glioblastom prin analiza qPCR, in scopul cresterii numarului de probe de glioblastom luate in lucru si a obtinerii unor rezultate semnificative din punct de vedere statistic.

Vom descrie initial rezultatele obtinute prin continuarea activitatiilor din cadrul obiectivului 2 al etapei I, si ulterior vom descrie in detaliu activitatile programate pentru anul 2014.

A. Evaluarea expresiei genelor implicate in invazia glioamelor in probele de glioblastom prin analiza qPCR

Protocolul de recoltare a probelor, de extractie a mARN si de efectuare a analizei qPCR a fost descris in detaliu in raportarea de la finalul etapei I/2013. Tinand cont de datele existente in literatura de specialitate a fost analizata expresia in tesutul tumoral a genelor mentionate in raportul etapei I, implicate in invazia glioamelor: PAFAH1B1 (LIS1), NDEL1, CDK5, MYH9, TWIST1, SNAI2 (5-8, 13-16). Intrucat s-a demonstrat ca celulele de glioblastom exprima o isoforma a GFAP caracteristica celulelor precursoare din zona subventriculara cerebrala (17), mentinand acest rationament s-a explorat in cadrul acestui proiect expresia unor gene caracteristice celulelor neuronale precurosare migratorii, cum ar fi gena LIS1 si miozina II (5,6,14). Ca expresie de referinta au fost folosite doua gene *house-keeping* Actina B (ACTB) si GAPDH. In cadrul etapei I s-a reusit analiza qPCR a expresiei genolr mentionate pentru 31 de probe, dintre care 10 probe normale si 21 de probe tumorale. In anul 2014 au fost incluse in studiu noi probe tumorale, astfel ca numarul total de probe luate in lucru a ajuns la 69 de probe dintre care 14 probe normale si 55 tumorale. Rezultatele expresiei qPCR al genelor luate in studiu in toate cele 69 de probe sunt prezentate in tabelul de mai jos (Tabel 1).

normalizare			actin	actin	GAPDH	actin	actin	actin
Sample	**Sample**	**Sample**	**SNAI2**	**LIS**	**TWIST1**	**CDK5**	**MYH9**	**NDEL1**
N	n1	1	0,6749327	1,1	0,1078667	1,1494912	2,8655238	1,7760257
N	n4	4	0,9462516	1,3788933	0,3066562	1,1740528	1,3451107	0,8012999
N	n6	6	1,153662	1,9943894	0,2706523	1,5002879	0,8551787	0,7951428
N	n10	10	0,78418565	2,4631116	0,3625726	0,9892368	1,2383419	1,1335291
N	n12	12	0,97599185	2,3525767	0,3028768	1,1885175	2,0488303	1,9741436
N	n15	15	2,1888669	0,69336116	57,029984	1,0856664	0,9782558	0,5261313
N	n19	19	0,51876605	2,4652798	0,3525888	1,356065	3,440769	2,257662
N	n26	26	1,095774	1,4440179	2,985024	1,3963466	1,2793784	1,1332624

N	n28	28	2,5241377	1,2284328	227,57576	0,9656269	2,012856	1,3490385
N	n30	30	1	1	1	1	1	1
N	n35	35	0,5348164	1,516513	0,2745844	1,2567084	3,439325	1,9086698
N	n50	50	0,31063914	0,6378862	0,2237834	1,2324991	1,7388849	0,3991498
N	n60	60	0,33678085	0,7424016	2,4950075	1,0844022	2,2522898	0,8750492
N	n69	69	1,5816196	0,39283273	11,603235	1,3208619	1,6366099	0,358656
G4	g4-2	2	3,192736	0,89717144	19,57778	0,2258378	1,2911986	0,4536128
G4	g4-5	5	1,9088831		10,790553	0,8998336	0,5791326	0,3439418
G4	g4-7	7	3,5717516	1,8053235	1,1385132	1,7938024	1,111368	0,6623674
G4	g4-9	9	3,3443635	0,8000256	1,7169864	0,0461709	3,3348596	1,6163797
G4	g4-13	13	0,4703629		4,878259	1,7439592	2,351938	0,7867881
G4	g4-14	14	3,422031	0,6709355	1,4012685	0,649862	1,0415183	0,4582166
G4	g4-16	16	2,8646147	0,9722431	10,681849	0,5488121	2,3003132	0,597667
G4	g4-17	17	4,6518636		77,985466	0,7772149	0,5926827	0,8300147
G4	g4-18	18	2,8478541	0,8877553	4,585317	0,8892837	0,6764384	1,0514443
G4	g4-20	20	1,4991231	0,78355414	3,1646574	0,7524809	2,0253797	1,0141844
G4	g4-21	21	29,245	1,7030469	0,2385029	0,6575629	1,5128391	0,9267684
G4	g4-22	22	3,988003	0,5921764	0,7719408	0,4488208	0,4927271	0,4272901
G4	g4-25	25	0,5564403	1,8502196	11,955679	1,0858573	0,5741252	0,6830797
G4	g4-27	27	4,4155273	0,86378944	61,336624	0,6625951	0,7126675	0,7138382
G4	g4-29	29	1,6148674	0,7816416	79,65067	0,4568896	1,3301022	0,9025892
G4	g4-36	36	4,62623	0,45391524	40,242218	0,8403888	2,3201578	0,4031062
G4	g4-40	40	3,0652282	0,7734155	4,408994	1,369331	2,4048038	0,336806
G4	g4-41	41	1,4157643	0,33492115	0,143188	0,4639296	1,5577198	0,3553785
G4	g4-43	43	0,29047558	0,9438865	5,220161	1,7207627	3,4705014	2,0440834
G4	g4-46	46	4,637617	0,43701303	13,427031	2,5740855	4,122891	0,4235704
G4	g4-47	47	3,483697	0,38275817	20,295422	0,6928809	3,271392	0,4530459
G4	g4-48	48	3,47046	0,47063917	1232,1271	1,3545989	3,8288715	0,3483994
G4	g4-49	49	4,5127873	0,4160622	86,97465	1,184777	3,32765	0,267408
G4	g4-51	51	0,16274476	0,2458869	2,66E-08	0,6900988	2,7792144	0,0587766
G4	g4-55	55	4,67951	0,4962683	36,11937	1,5336149	0,757222	0,4876883
G4	g4-57	57	1,7145797	0,51221544	0,2282752	0,8638431	1,6642057	0,2606624
G4	g4-58	58	16,60257	0,8801585	613,81116	1,1665877	3,7830327	0,7662422
G4	g4-62	62	14,095978	0,32623896	613,81116	1,1665877	3,7830327	0,7662422
G4	g4-66	66	8,9248495	0,43509337	1215,6658	1,749158	5,3047953	0,6837325
G4	g4-67	67	2,4027183	0,8211608	81,282104	1,6472945	0,8262585	0,6634226
G4	g4-68	68	1,2693882	0,21300572	29,341976	0,6245123	4,198156	0,1870508
Gg3	g4-42	42	64,569145	0,51125443	3349,8125	1,3105843	0,6540021	0,8123602
G4	g4-63	63	5,634425	0,26670825	17,853788	0,1806208	3,59724	1,2749629
G4	g4-56	56	2,5002875	0,3134505	172,46667	1,7414806	1,1930535	0,1850922
A4	a4-23	23	4,1156287	1,8147094	6,0058503	1,1670161	0,4482096	0,7928963
A3	a4-11	11	2,900983	0,6802351	0,0050859	0,9061351	2,470877	0,4491975
A3	a4-39	39	2,9706857	1,0391644	92,1751	0,761427	3,2198162	1,1631088
A2	a4-3	3	0,44225997	2,6043985	0,2423265	2,0375364	1,0620816	1,1646429
A2	a4-8	8	1,2081627	4,2439437	2,9952412	2,3658884	0,7651555	0,9273132
A2	a4-32	32	0,20543556	1,639407	5,212275	1,9971213	1,1563962	0,8535538
A2	a4-34	34	0,5191022	1,6104385	0,1750345	1,1364878	1,2806332	0,7613568
A2	a4-65	65	0,18945585	0,9029921	3,2385302	2,1115248	1,9727054	1,2287071
A	a4-59	59	0,66915	0,8856938	25,712393	4,702592	2,0853221	0,7689731

HTB14	**HTB14**	**HTB14**	**23,63285**	**0,19919638**	**191,79683**	**0,7297989**	**5,111779**	**2,015784**
G4	GM-54	54	7,1417303	0,21249886	0,0641615	1,839141	1,902634	0,1759097
Ge	GE-31	31	1,3391132	0,33470514	77,37963	0,6478979	1,4708928	0,4290154
AP1	AP1-61	61	1,0472172	0,7123309	3,4022565	1,271499	3,6442165	0,7738772
OG3	OG3-44	44	7,9978375	1,9566491	1,0516542	5,275719	1,2407566	1,4662437
OG3	OG3-52	52	0,89612865	0,83994657	0,2013261	1,1578295	1,9832059	0,8628495
OG2	OG2-64	64	2,6950877	0,32492846	208,10793	6,3470855	1,1222928	0,5144352
Og	OG-24	24	0,52404284	2,1186123	0,083276	0,6813225	0,8916391	1,412557
Oa2	OA2-33	33	0,23408303	0,659317	4,0587144	2,121049	0,8875228	0,3219472
Oa2	OA2-37	37	0,3146258	1,3507082	18,182789	1,5715398	2,4422646	1,5082309
G4	???-70	70	5,2001953	0,220992	171,6732	1,182272	4,8172584	0,4143169
TPE	TPE-45	45	1,3523018	1,4100994		2,229959	2,526271	

Tabel 1. Expresia genelor SNAI2, LIS 1, TWIST1, CDK5, MYH9 (miozin II), NDEL1 cuantificata prin qPCR in tesutul tumoral (55 probe) comparativ cu tesutul normal (14 probe). Legenda: N - normal, G4 - glioblastom grad IV, A3 - astrocitom anaplazic grad III, A2-astrocitom difuz, grad II, AP-astrocitom pilocitic, grad 1, OG3-oligodendrogliom anaplazic, grad 3, OG2-oligodendrogliom, grad 2, Oa2-oligoastrocitom, grad 2, TPE-tumora primitva ectodermala, Ge-germinom, Gg3-gangliogliom anaplazic, grad 3.

In graficele de mai jos sunt exprimate expresia qPCR a genelor studiate in probele luate in lucru astfel: gena SNAI2 (Fig. 1), gena LIS1 (Fig.2), gena TWIST1 (Fig.3), gena CDK5 (Fig.4), gena MYH9/miozin II (Fig.5) si gena NDEL1 (Fig.6).

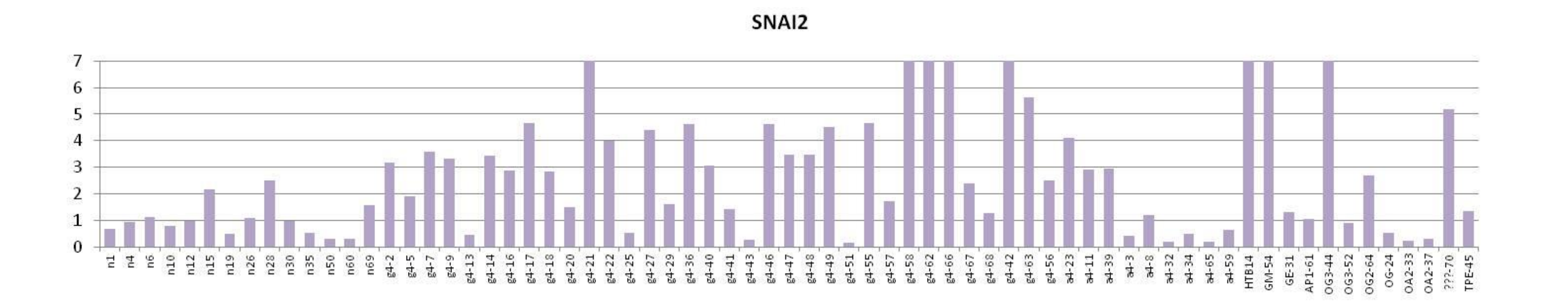


Fig.1. Graficul valorilor expresiei genei SNAI2 evauata prin tehnica qPCR in probele normale si tumorale.

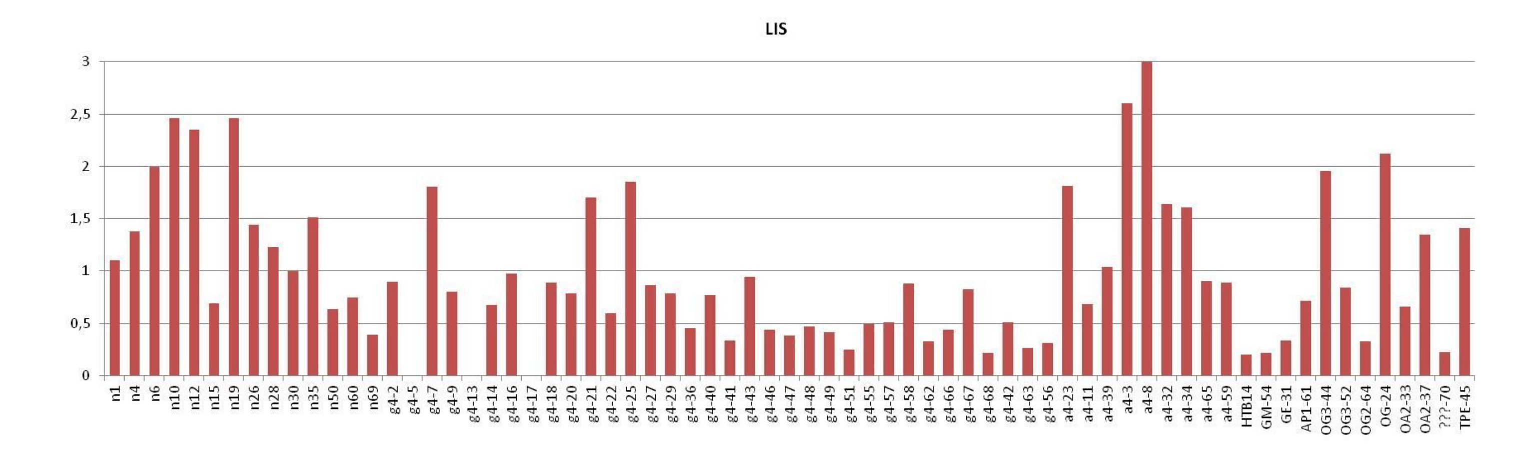


Fig.2. Graficul valorilor expresiei genei LIS1 evauata prin tehnica qPCR in probele normale si tumorale.

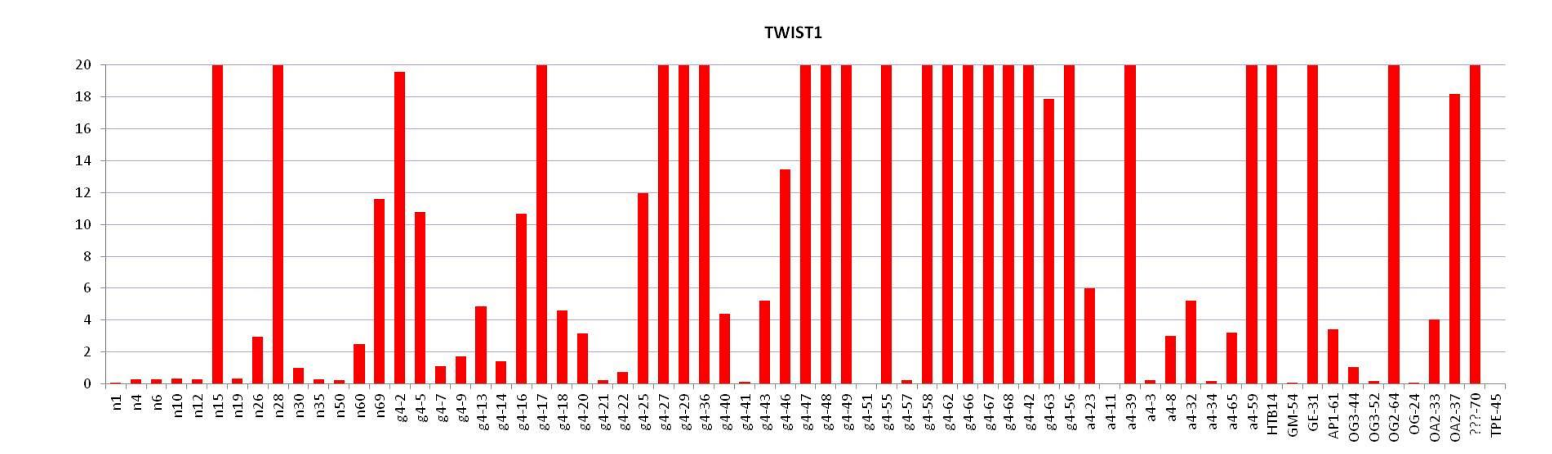


Fig.3. Graficul valorilor expresiei genei TWIAT1 evauata prin tehnica qPCR in probele normale si tumorale.

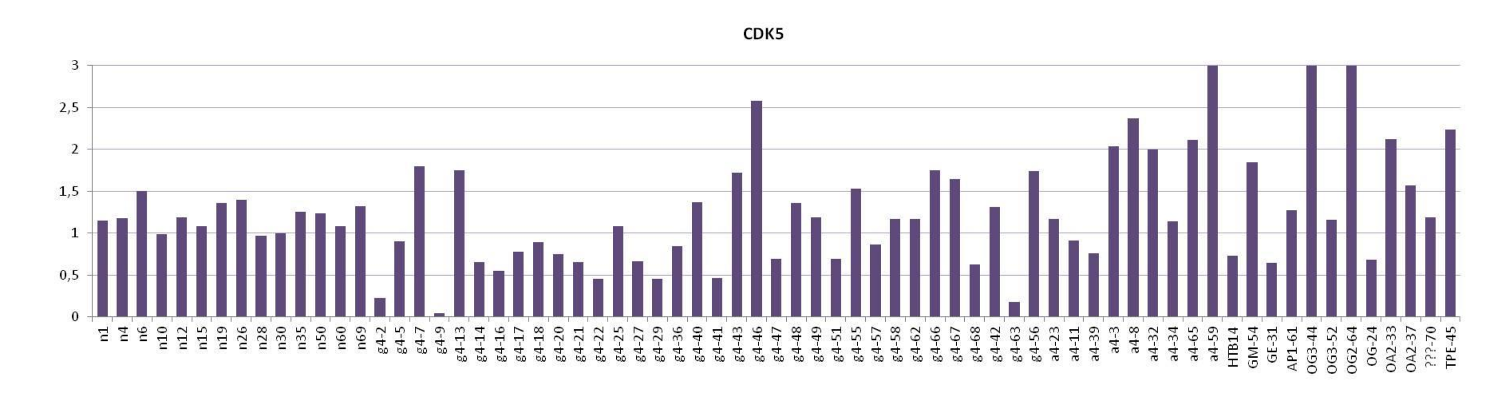


Fig.4. Graficul valorilor expresiei genei CDK5 evauata prin tehnica qPCR in probele normale si tumorale.

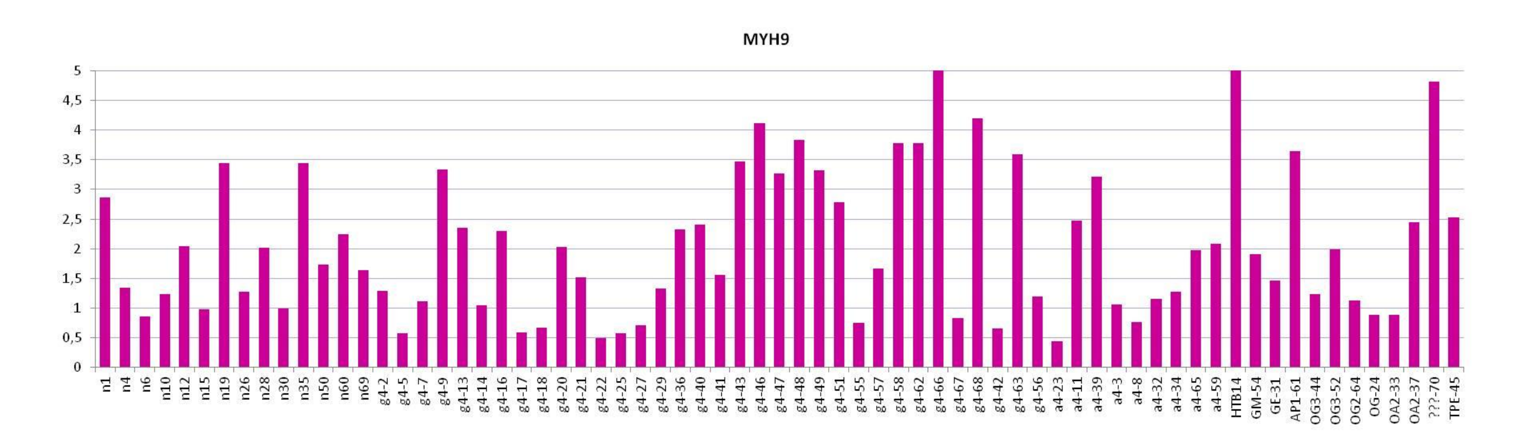


Fig.5. Graficul valorilor expresiei genei MYH9/myozin II evauata prin tehnica qPCR in probele normale si tumorale.

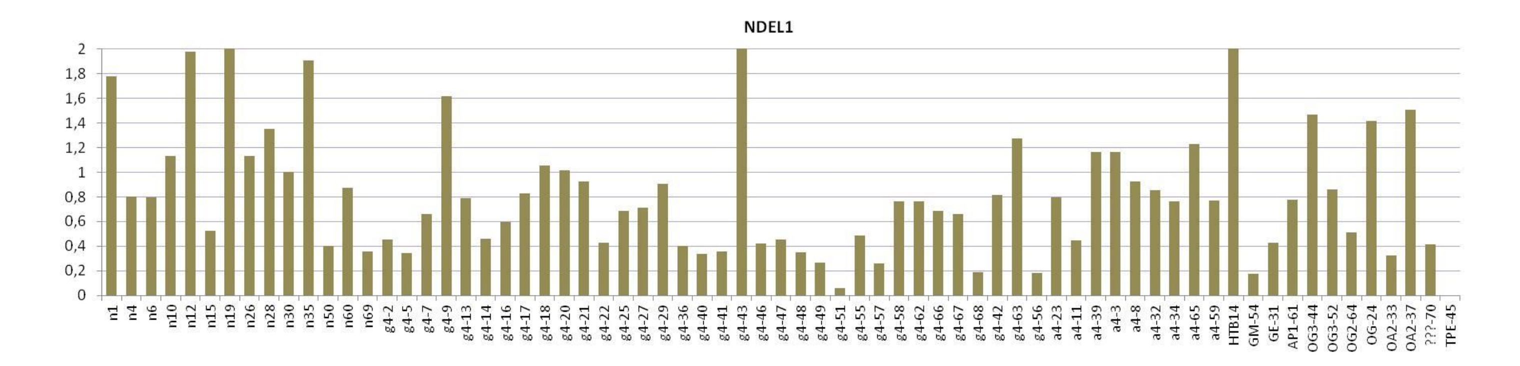


Fig.6. Graficul valorilor expresiei genei NDEL1 evauata prin tehnica qPCR in probele normale si tumorale.

Calculand media expresiilor genelor luate in studiu intre probele normale, probele de glioblastom (grad IV) si probele de astrocitom grad II, observam o diferenta semnificativa pentru genele SNAI2 si TWIST, reconfirmand astfel rezultatele preliminarii obtinute in etapa I (Tabel 2)

mean	normal	Glioblastoma (grad IV)	Astrocitoma (grad II)	**st dev**	n	g	a
SNAI2	1,044745	6,342702	1,468985	**SNAI2**	0,656225	11,68792	1,466646
LIS	1,386407	0,704579	1,713443	**LIS**	0,698653	0,427125	1,122929
TWIST1	21,7779	230,0913	15,08465	**TWIST1**	61,11445	633,3267	29,98384
CDK5	1,19284	1,015121	1,909525	**CDK5**	0,161813	0,566112	1,201467
MYH9	1,866525	2,140338	1,6068	**MYH9**	0,868088	1,35468	0,892187
NDEL1	1,163411	0,6543	0,901083	**NDEL1**	0,609924	0,41066	0,250322
TWIST1	1,037043	10,95673	0,718317	**TWIST1**	2,910212	30,15841	1,427802

Tabel 2. Media expresiei genelor luate in studiu intre probele normale, probele de glioblastom, grad IV si cele de astrocitom, grad 2.

Observand aceste diferente, am realizat o analiza statistica separata pentru cele doua gene (TWIAT1 si SNAI2), comparand expresia lor intre probele normale si probele de gliom de gradul I-IV. Am exclus astfel cazurile de tumori altele decat glioanele (germinom,tumora primitiva neuroectomerdmica, etc). Tabelul expresiei celor doua gene in probele selectate este expus mai jos (Tabel 3). Am analizat in plus, expresia qPCR a celor doua gene si in linia de glioblastom HTB14 (U87) pe care o utilizam in proiect.

Sample	Number	SNAI2	TWIST1
N	1	0,6749327	0,1078667
N	4	0,9462516	0,3066562
N	6	1,153662	0,2706523
N	10	0,7841857	0,3625726
N	12	0,9759919	0,3028768
N	15	2,1888669	57,029984
N	19	0,5187661	0,3525888
N	26	1,095774	2,985024
N	28	2,5241377	227,57576
N	30	1	1
N	35	0,5348164	0,2745844
N	50	0,3106391	0,2237834
N	60	0,3367809	2,4950075
N	69	1,5816196	11,603235
G4	2	3,192736	19,57778
G4	5	1,9088831	10,790553
G4	7	3,5717516	1,1385132
G4	9	3,3443635	1,7169864
G4	13	0,4703629	4,878259
G4	14	3,422031	1,4012685
G4	16	2,8646147	10,681849
G4	17	4,6518636	77,985466
G4	18	2,8478541	4,585317
G4	20	1,4991231	3,1646574
G4	21	29,245	0,2385029

G4	22	3,988003	0,7719408
G4	25	0,5564403	11,955679
G4	27	4,4155273	61,336624
G4	29	1,6148674	79,65067
G4	36	4,62623	40,242218
G4	40	3,0652282	4,408994
G4	41	1,4157643	0,143188
G4	43	0,2904756	5,220161
G4	46	4,637617	13,427031
G4	47	3,483697	20,295422
G4	48	3,47046	1232,1271
G4	49	4,5127873	86,97465
G4	51	0,1627448	2,66E-08
G4	55	4,67951	36,11937
G4	57	1,7145797	0,2282752
G4	58	16,60257	613,81116
G4	62	14,095978	613,81116
G4	66	8,9248495	1215,6658
G4	67	2,4027183	81,282104
G4	68	1,2693882	29,341976
G4	63	5,634425	17,853788
G4	56	2,5002875	172,46667
G4	23	4,1156287	6,0058503
G4	70	5,2001953	171,6732
G4	54	7,1417303	0,0641615
G3 (og)	59	0,66915	25,712393
G3	42	64,569145	3349,8125
G3	11	2,900983	0,0050859
G3	39	2,9706857	92,1751
G3 (og)	24	0,5240428	0,083276
G3 (og)	52	0,8961287	0,2013261
G3 (og)	44	7,9978375	1,0516542
G2	3	0,44226	0,2423265
G2	8	1,2081627	2,9952412
G2	32	0,2054356	5,212275
G2	34	0,5191022	0,1750345
G2	65	0,1894559	3,2385302
G2 (og)	64	2,6950877	208,10793
G2 (oa)	33	0,234083	4,0587144
G2 (oa)	37	0,3146258	18,182789
G1	61	1,0472172	3,4022565
HTB14	60	**23,63285**	**191,79683**

Tabel 3. Expresia genelor SNAI2, si TWIST1 cuantificata prin qPCR in probele de glioame: glioblastom-grad IV (36 probe) comparativ cu gliom grad III (7 probe), gliom grad II (8 probe), gliom grad 1 (o proba) si linia de glioblastom HTB14 (U87). Legenda: N - normal, G4 - glioblastom grad IV (glioblastom), G3 - gliom grad III (astrocitom anaplazic, oligodendrogliom (og) anaplazic), G2 - gliom grad II (astrocitom difuz, oligodendrogliom (og), oligoastrocitom (oa)), G1-gliom grad 1 (astrocitom pilocitic).

Am efectuat analiza statistica a expresiei genelor SNAI2 si TWIST1 cuantificata prin qPCR, comparand expresia acestora intre probele normale (14 probe), probele de gliom grad IV (36 probe), probele de gliom grad III (7 probe), cele de gliom grad II (8 probe) si proba de astroctiom pilocitic (gliom grad I). Proba provenita din linia de glioblastom HTB14 nu a fost inclusa in calculul statistic.

- Diferenta dintre tesutul tumoral (incluzand toate probele de glioame grad I-IV incluse in studiu - 52 probe) si tesutul normal (66 probe). Am aplicat testul Kolmogorov-Smirnov test pentru a verifica distributia valorilor TWIST si SNAI. Distributia valorilor SNAI (mean=4,08, standard deviation=8,76) ($p<0,001$) si TWIST (mean=131,37, standard deviation=464,67) nu sunt normale ($p<0,001$). Tinand cont de acest rezultat, s-au utilizat testele non-parametrice (testul Mann-Whitney U). Utilizand acest test, se observa ca mean rank=37,00 a expresiei SNAI2 in probele tumorale este semnificativ statistic mai mare decat in probele normale (mean rank=20,50) (U=182,00, p=0,004). De asemenea, mean rank=36,17 a expresiei genei TWIST1 in probele tumoralea fost semnificativ statistic mai mare decat in probele normale (mean rank=23,57) (U=225,00, p=0,029).

- Differenta intre gradele tumorale (52 probe). A fost utilizat testul non-parametric Kruskal-Wallis H, care a aratat ca exista diferente semnificativ statistice a valorilor SNAI2 intre probele tumorale de diferite grade (chi square=14,42, $p<0,001$). Astfel, mean rank a SNAI2 score a fost de 14,00 pentru gradul 1, 8,75 pentru gradul 2, 27,00 pentru gradul 3 si 30,69 pentru gradul 4. Desi exista diferente evidente intre mean rank a TWIST1 ale probelor tumorale de grad I-IV, acestea nu sunt semnificative statistic (chi square=2,313, p=0,510), cu un mean rank de 19,00 pentru gradul 1, 21,63 pentru gradul 2, 22,29 pentru gradul 3 si 28,61 pentru gradul 4.

Diferentele intre valorile medii ale expresiei SNAI2 si TWIST1 intre probele normale si probele tumorale (glioame grad I-IV) sunt ilustrate in Fig.7 si Fig.8

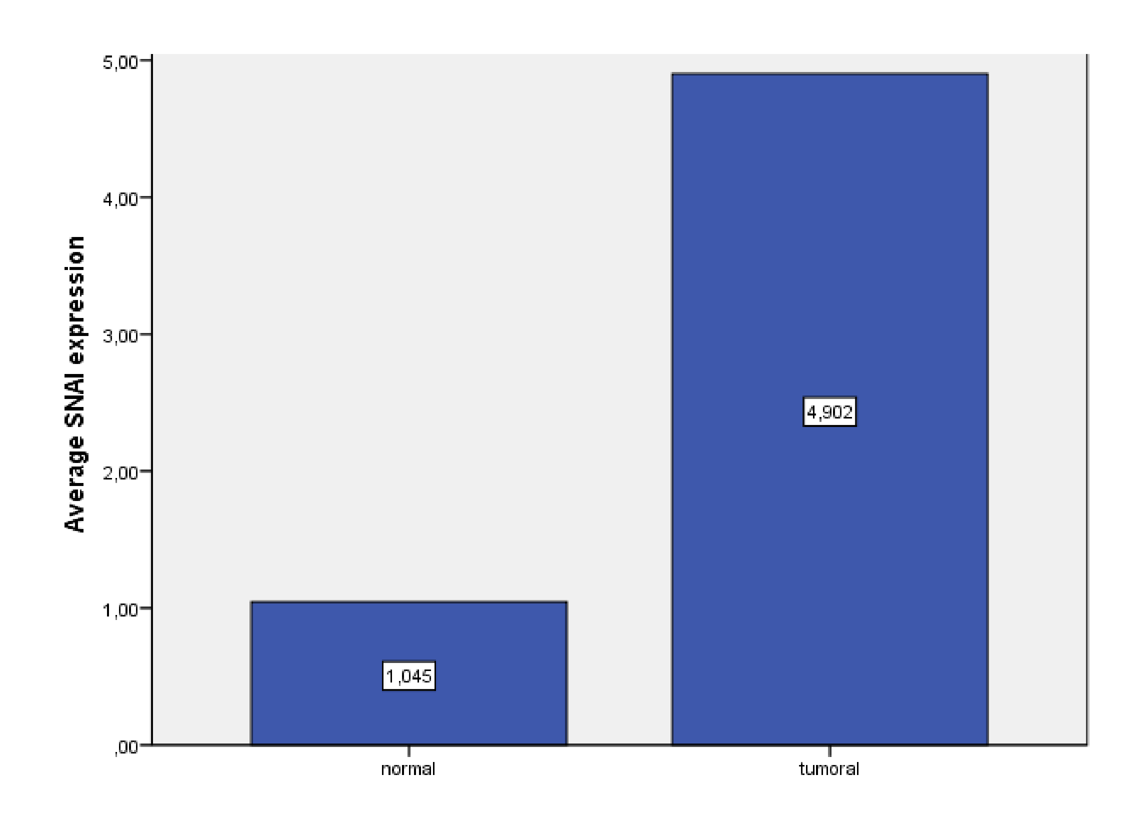


Fig. 7. Valorile medii ale expresiei genei SNAI2, cuantificate prin qPCR, in probele normale si tumorale

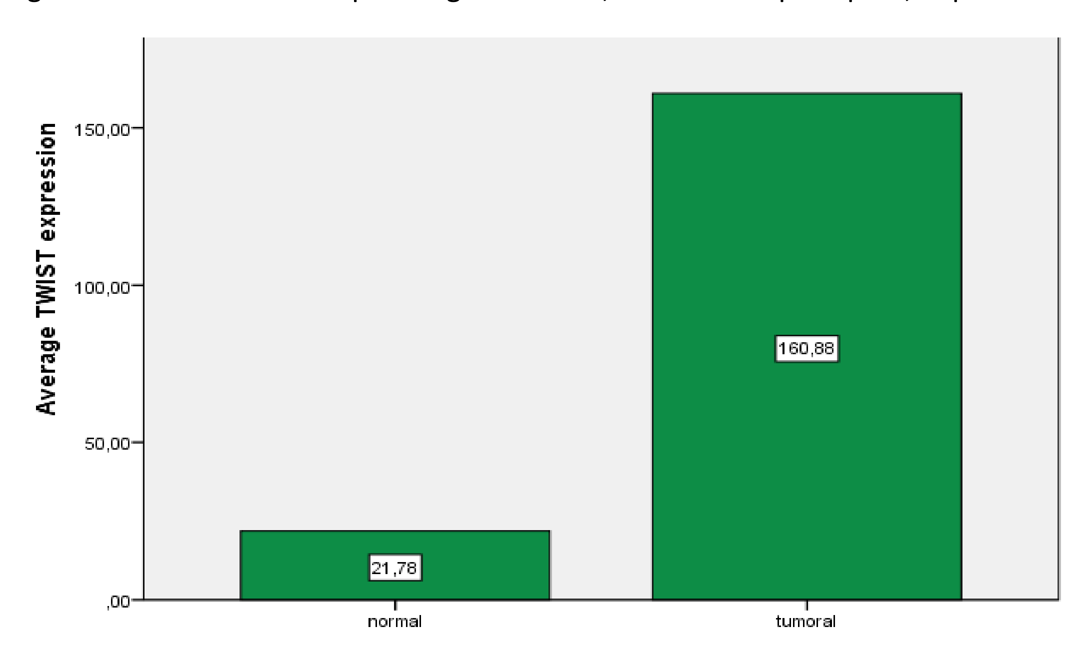


Fig. 8. Valorile medii ale expresiei genei TWIST1, cuantificate prin qPCR, in probele normale si tumorale

Rezultatele obtinute in aceasta etapa confirma analizele preliminarii relaizate in etapa precedenta (etapa I). Avand la dispozitie un numar mult mai mare de probe comparativ cu etapa precedenta, am putut obtine rezultate inalt semnificative statistic, care au demonstrat fara echivoc faptul ca doua dintre genele analizate, respectiv gena SNAI2 si gena TWIST1 sunt supraexprimate in glioamele cerebrale. Mai mult, pentru gena SNAI2 s-a putut observa o relatie directa intre gradul de malignitate tumorala si gradul expresiei, expresia genei fiind maxima pentru gradul IV,, cel mai inalt grad de malignitate al glioamelor cerebrale. Aceste rezultate sunt in concordanta cu rezultatele obtinute si publicate recent in literatura de specialitate citare TWIST, SNAI). Tinand cont ca existe date care sugereaza implicarea acestor gene in invazia glioamelor (5,6,13), acestea devin potentiale tinte terapeutice pentru terapia moleculara anti-invaziva in glioblastom.

Pentru gena LIS1, gena ce urmeaza a fi studiata, conform propunerii de proiect acceptate la finantare, nu s-a observat o supraexprimare in probele tumorale comparativ cu cele normale. Acest rezultat este totusi in concordanta cu observatiile publicate in singurul articol gasit de autori in literatura de specialitate care evalueaza expresia LIS1 in glioamele cerebrale (14). Astfel, autorii respectivului articol au observat la nivel de expresie proteica (evaluare Western blot) ca nivelul expresiei LIS1 in tesutul cerebral este relativ similar cu cel din tesutul tumoral. Evaluarea imunohistochimica arata insa diferentele. Astfel, daca in tesutul normal cerebral exista o expresie difuza a proteinei LIS1, la nivelul probelor tumorale analizate (glioame maligne, grad III-IV), exista o expresie intensa a LIS1 preponderent la nivelul celulelor tumorale infiltrative, in timp ce populatia celulara tumorala neinfiltrativa nu exprima aceasta proteina. Tinand cont de aceste observatii, in cadrul obiectivului 2 al etapei actuale, s-a realizat inhibarea expresiei genei LIS1, prin transfectie shRNA, in conformitate cu obiectivele prezentate in propunerea de proiect acceptata la finantare, urmand ca in etapele urmatoare sa investigam in detaliu si rolul genei SNAI2, gena la care am demonstrat in mod neechivoc o supraexprimare in probele tumorale comparativ cu cele normale.

B. Prezentarea rezultatelor obtinute in urma activitatilor corespunzatoare etapei II a proiectului

Obiectiv 1. Evaluarea eficientei unui nou model experimental de invazie in glioblastom: model tip „organotypic brain slices"

Activitate 1.1. Inocularea liniilor si a culturilor primare de glioblastom la nivelul sectiunilor tisulare obtinute in etapa anterioara si monitorizarea migrarii celulelor tumorale prin microscopie in fluorescenta si

Activitate 1.2. Evaluare eficientei noului model experimental de invazie comparativ cu modelele existente

Modelul experimental dezvoltat de autori din probele tisulare recoltate in timpul procedurilor de biopsie stereotactica in etapa I a proiectului este util pentru evaluarea imunohistochimica a celulelor tumorale ce infiltreaza periferia tumorala. Pentru evaluarea migrarii unor celule tumorale la care s-a inhibat activitatea genelor implicate in invazia tumorala este necesara dezvoltarea unui model experimental accesibil ce permite inocularea celulelor tumorale marcate fluorescent. In cadrul acestei etape vom descrie dezvoltarea unui astfel de model experimental. Aceaste activitati presupun desfasurarea urmatoarelor experimente: obtinerea sectiunilor tisulare cerebrale, mentinerea sectiunilor tisulare, inocularea/cocultivarea celulelor de glioblastom marcate fluorescent, urmarirea pattern-ului de migrare al celulelor de glioblastom si compararea cu modelele experimentale publicate in literatura de specialitate. Aceasta evaluare a modelului experimental dezvoltat in cadrul prezentului proiect se va face prin descrierea elementelor de noutate pe care autorii le-au dezvoltat in carul fiecarei etape din cadrul experimentelor desfasurate.

Pentru obtinerea sectiunilor cerebrale, au fost utilizati soareci din linia NMRI (Fig.9), cu varste cuprinse intre 3 si 6 zile. Experimentele s-au desfasurat in conformitate cu legislatia nationala si europeana, privind etica in cercetare si cu aprobarea Comisiei de Etica a Spitalului Clinic de Urgenta "Bagdasar-Arseni".



Fig.9. Aspectul fenotipic al soarecelui din linia NMRI utilizat in experimente

Pentru anestezierea animalelor s-au utilizat 1 mg de fenobarbital, injectat intraperitoneal. Aceasta doza induce o coma si analgezie profunda in aproximativ 3 minute de la injectare. Dupa inducerea comei,

animalul este imersat in apa cu gheata timp de 3 minute, dupa care se initiaza tehnica chirurgicala de recoltare a encefalului. Mentionam ca aceasta tehnica este o adaptare a protocoalelor existente in literatura de specialitate (5,8,12). Astfel elementele de noutate constau in inducerea comei barbituricare, urmata de hipotermie profunda, elemente ce au ca scop reducerea metabolismul cerebral la minimum, astfel incat sa fie mentinuta viabilitatea tesutului cerebral pana la recoltarea encefalului si obtinerea sectiunilor cerebrale.

Etapa chirurgicala se desfasoara in hota de lucru, cu flux laminar (Fig.10) si presupune utilizarea unui instrumentar chirurgical steril adecvat format din microfoarfeci, pense anatomice si chirurgicale si minispatule (Fig.11).



Fig.10. Hota cu flux laminar utilizata in experimente



Fig.11. Instrumentarul microchirurgical utilizat in experimente

Extremitatea cefalica a soarecelui este badijonata cu betadina pentru a preveni infectarea sectiunilor cerebrale. Se indeparteaza rapid scalpul si cu mare grija calvaria expunand intreg encefalul, fara a-l leza (Fig.12).



Fig.12. Expunerea encefalului soarecelui fara a-l leza prin manopera chirurgicala desfasurata

Cu ajutorul spatulei cauciucate si a microdisectorului se extrage encefalul in intregime din cutia craniana si se imerseaza rapid in solutie PBS (phosphate buffered solution) rece (temperatura de 2-4 grade C) pentru a se spala urmele de sange (Fig.13)

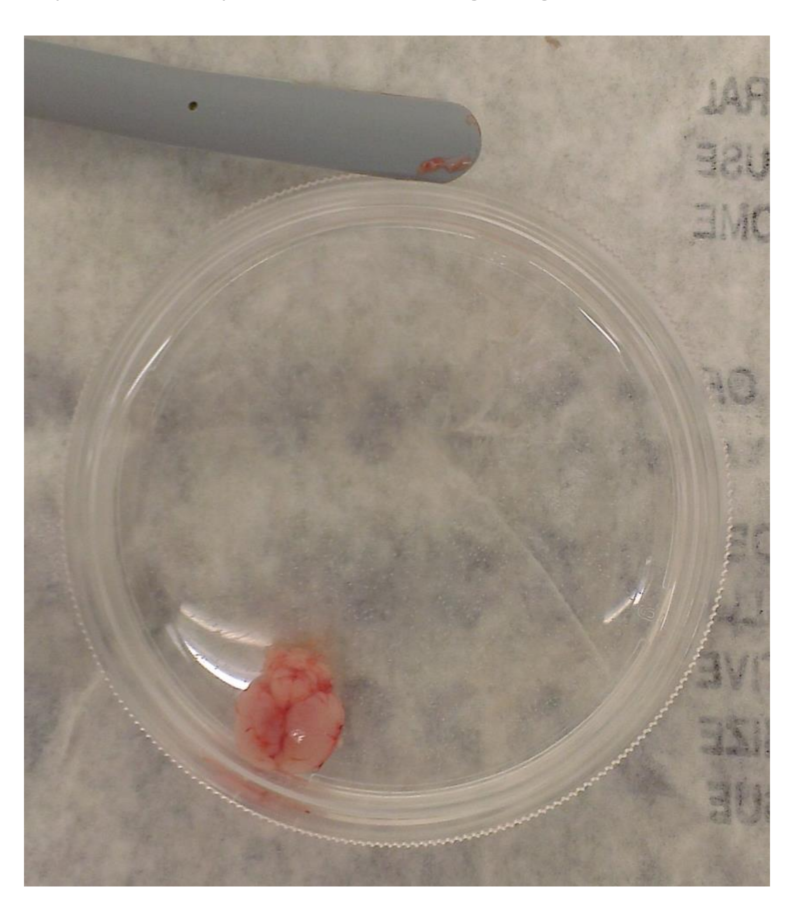


Fig.13. Encefalul recoltat si izolat, imersat in PBS

Encefalul este sectionat cu ajutorul unui microtom (Fig.14), obtinandu-se sectiuni cu grosimi de aproximativ 500 micrometrii grosime. Aceste sectiuni sunt plaste pe un suport special de cultura, ce contine o membrana poroasa. Suporturile sunt la randul lor imersat in godeuri umplute cu mediu de cultura (Fig.15). Membrana poroasa asigura suportul si aderenta necesara pentru stiunea tisulara, iar mediul de cultura asigura nutrientii necesari pentru mentinerea viabilitatii sectiuni tisulare.



Fig.14. Microtom pentru sectiuni tisulare

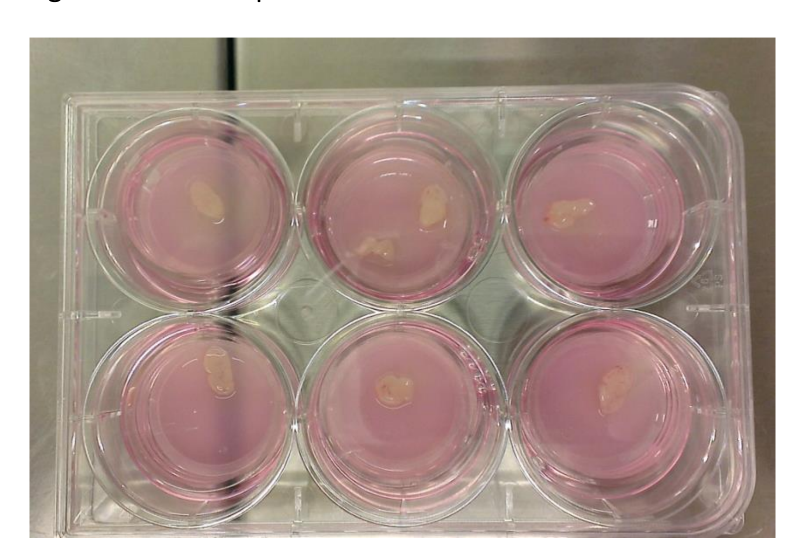


Fig.15. Sectiunile tisulare depuse pe membranele de cultura

Fiecare godeu este umplut cu aproximativ 1ml mediu de cultura DMEM imbogatit cu glutamina, ser fetal 15% si antibiotic 1%. Mediul se schimba zilnic opentru a mentine viabilitatea sectiunilor tisulare. Dupa 48 de ore de la obtinerea sectiunilor se poate initia experimentul de inoculare a sectiunilor cu celule de glioblastom. In acest sens, pentru a putea monitoriza corespunzator proliferarea si migrarea celulelor tumorale, am utilizat linia de glioblastom HTB14 (U87) transfectata stabil cu gena de sinteza a proteinei "green fluorescence protein" (Fig.16). In cadrul proiectului am avut la dispozitie doua linii celulare: linia U87 si linia U251. Prin cultivari succesive, am constatat ca linia U87 isi mentine ritmul constant de crestere, iar experimentele ce implica aceasta linie sunt reproductibile. Prin urmare am optat pentru utilizarea liniei HTB14 (U87) pentru experimentele din cadrul etapei II.

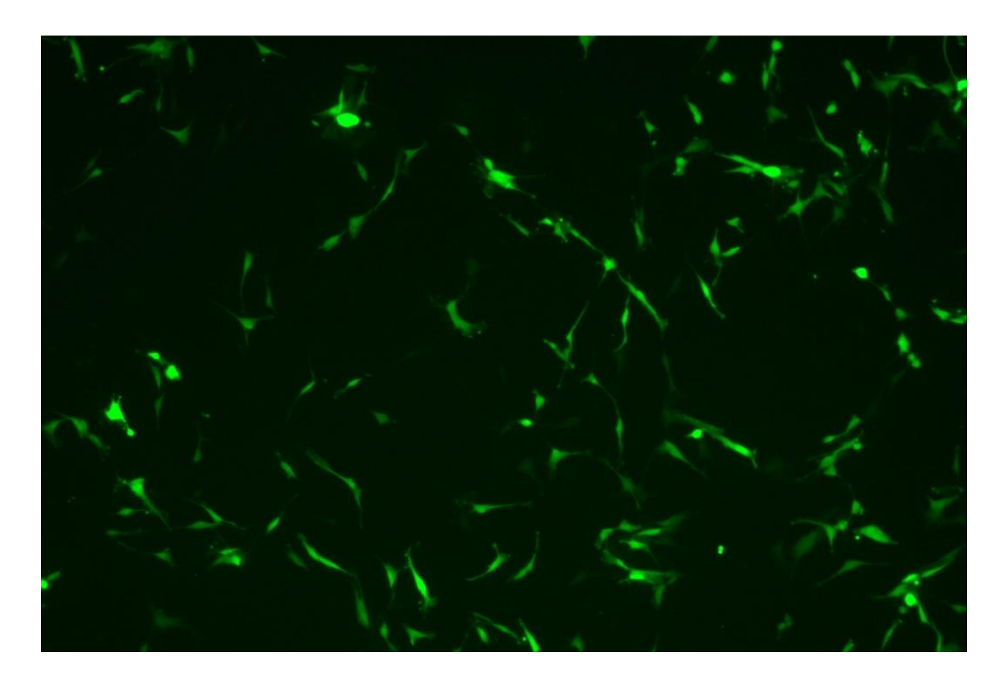


Fig.16. Linia HTB14 (U87) transfectata cu green fluorescence protein (GFP)

Celulele sunt inoculate sub forma de supsensie celulara. Astfel se vor desprinde celulele de glioblastom de pe placa de cultura prin tripsinizare. Se vor concentra la o densitate de 10.000 celule/microlitru. Pentru injectare se va folosi sistemul automat de injectare ce permite incarcarea unei microseringi Hamilton si controlul electronic al ratei de injectare, de aproximativ 2 microlitri pe minut (Fig.17). Se injecteaza 5 microlitri, ce contine aproximativ 50.000 de celule. Injectarea se face in conditii sterile in hota de lucru cu flux laminar.



Fig.17. Injector automat cu seringa Hamilton

Dupa injectare se monitorizeaza migrarea celulelor de glioblastom prin examinarea si inregistrarea imaginilor obtinute la intervale regulate de 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12 si 14 zile de la injectare. Pentru achizitionarea imaginilor in fluorescenta s-a utilizat microscopul Zeiss Axiovert A1, echipat cu filtrul de fluorescenta Fs52 si sistem de achizitie de imagine, ce include camera Axio cam ERc5s si softul de achizitie AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 (fig.18).



Fig.18. Microscopul Axiovert A1 Zeiss cu filtrele de fluorescenta si sistemul de achizitie de imagini

Urmand protocolul descris in literatiura ce mentiona utilizarea seringii Hamilton pentru a inocula sectiunile tisulare cu suspensia celulara de glioblastom am observat ca o mare parte din celule nu raman in sectiune datorita scurgerii lor pe suprafata sectiunii catre periferie (Fig.19)

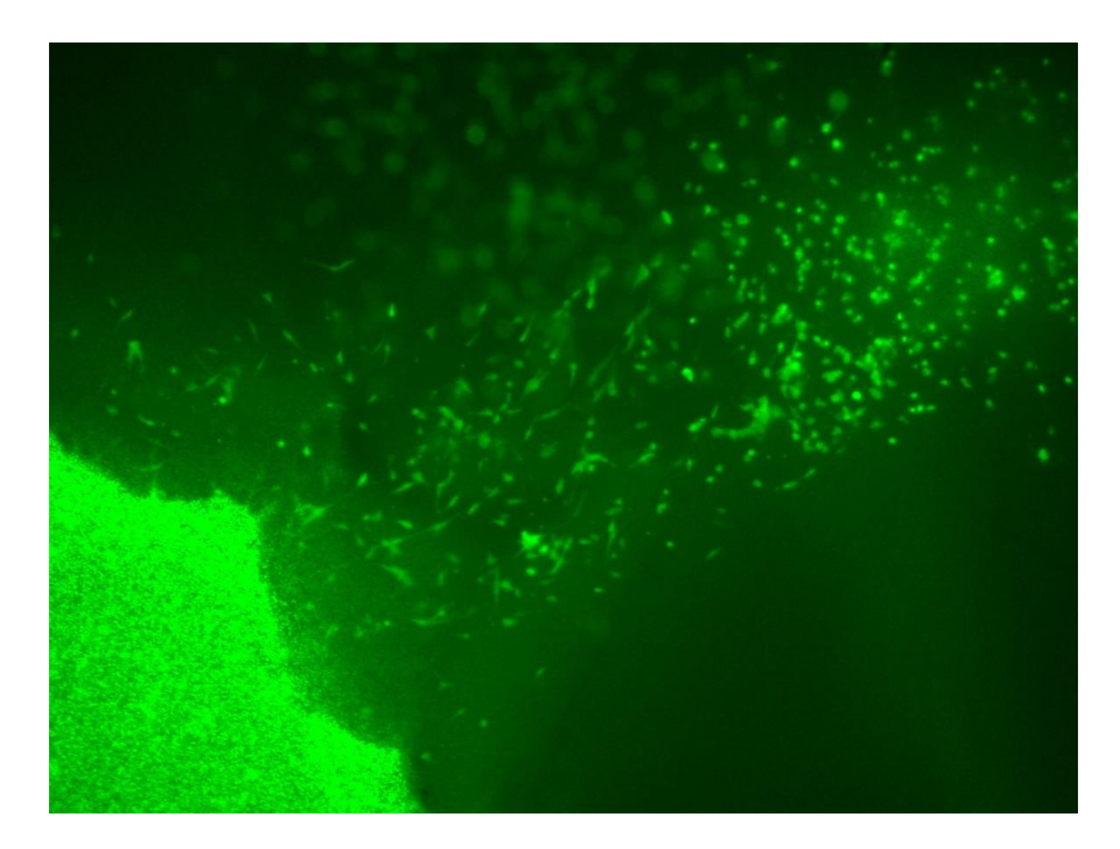


Fig. 19. Defect de injectare datorat formei bizoului acului Hamilton. Se observa scurgerea suspensiei celulare inspre periferia sectiunii

Explicatia pentru acest fenomen consta in lungimea mare a bizoului seringii Hamilton, care depaseste grosimea sectiunii tisulare. Am adaptat astfel protocolul prin modificarea seringii Hamilton. Am sectionat perpendicular, cu ajutorul unor foarfeci chirurgicale, acul, astfel incat orificiul de injectare sa poata fi introdus complet in interiorul sectiunii. In acest mod am reusit sa inoculam celulele strict la nivelul sectiunii.

Prin realizarea achizitiilor de imagini s-a putut evalua proliferarea si invazia tesutului cerebral de catre celulele de glioblastom marcate fluorescent. S-a comparat pentru fiecare sectiune migrarea celulelor fata de locul de inoculare, localizat la nivelul centrului sectiunii. S-a utilizat softul AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 pentru masurarea distantelor de migrare. S-a luat ca referinta momentul t0 - momentul injectarii sectiunilor. Imaginile achizitionate la acel moment indica prezenta unor celule fluorescente, rotunde (Fig.20)

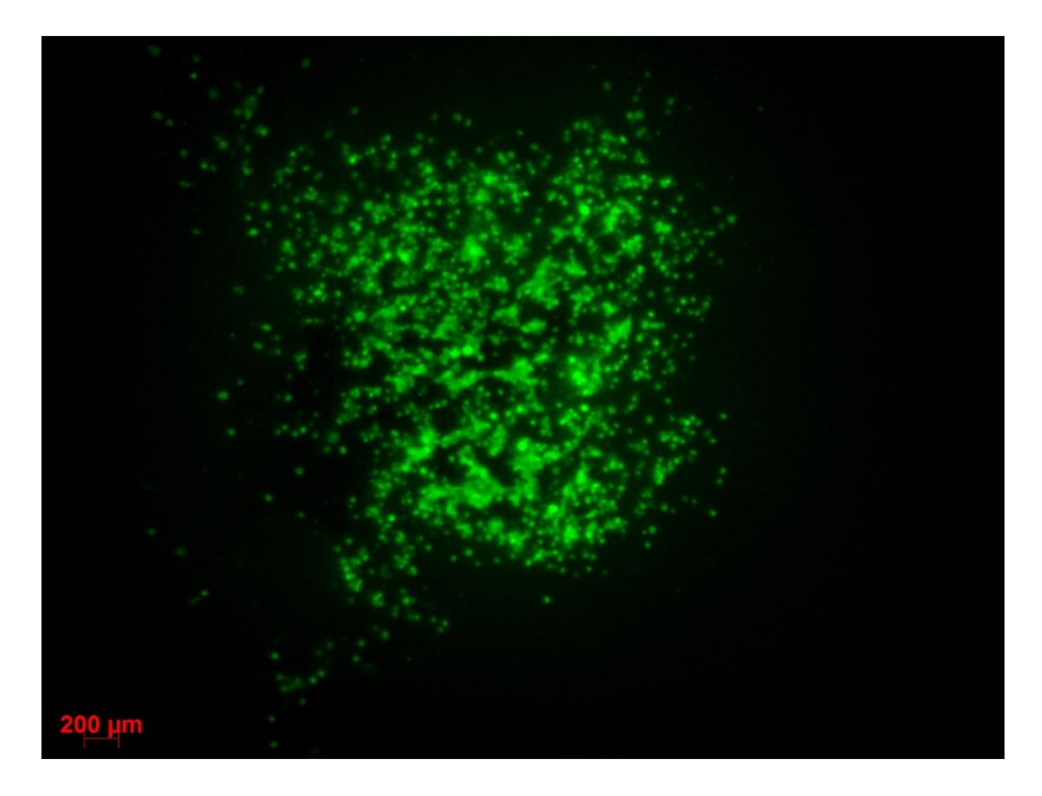


Fig.20. Aspectul celulelelor de glioblastom HTB14 transfectate cu GFP la locul de inoculare intratisular

La 24 de ore, desi exista cateva celule migratorii in periferie, majoritatea celulelor isi pastreaza morfologia initiala de la injectare (Fig.21)

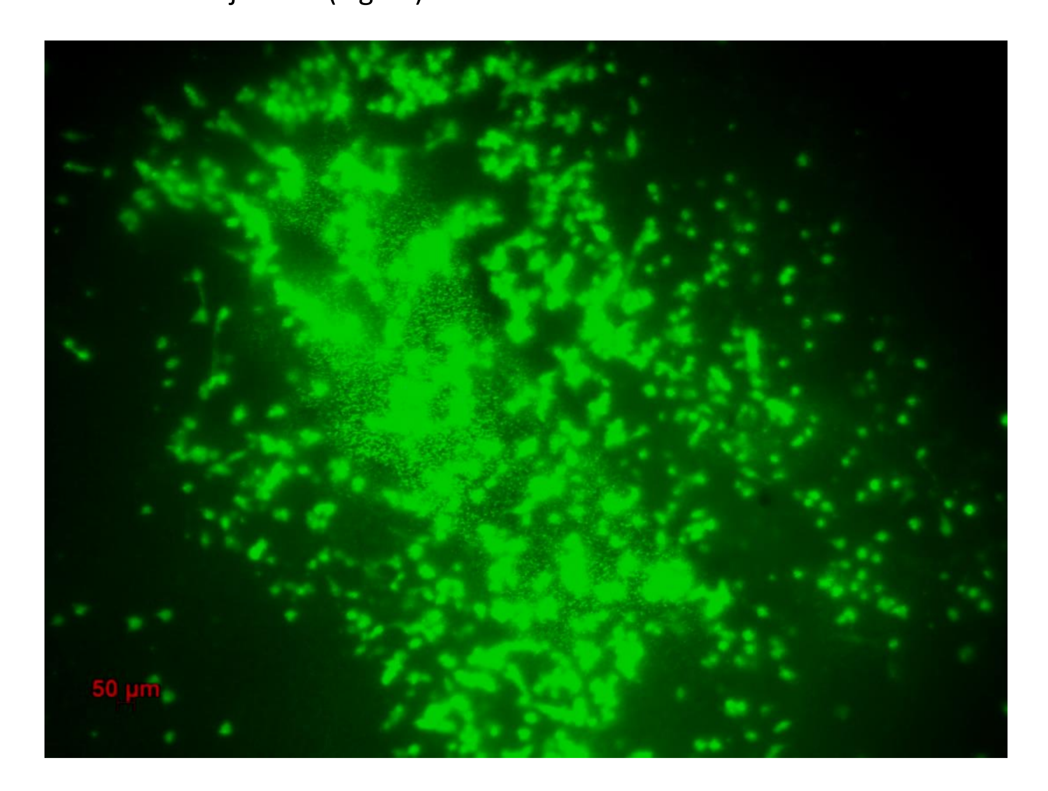


Fig.21. Aspectul celulelor de glioblastom HTB14 transfectate cu GFP la 24 de ore de la injectare

La 72 de ore de la injectare o parte importanta a populatiei celulare prezinta un fenotip infiltrativ si incep sa migreze spre periferia sectiunii (Fig.22)

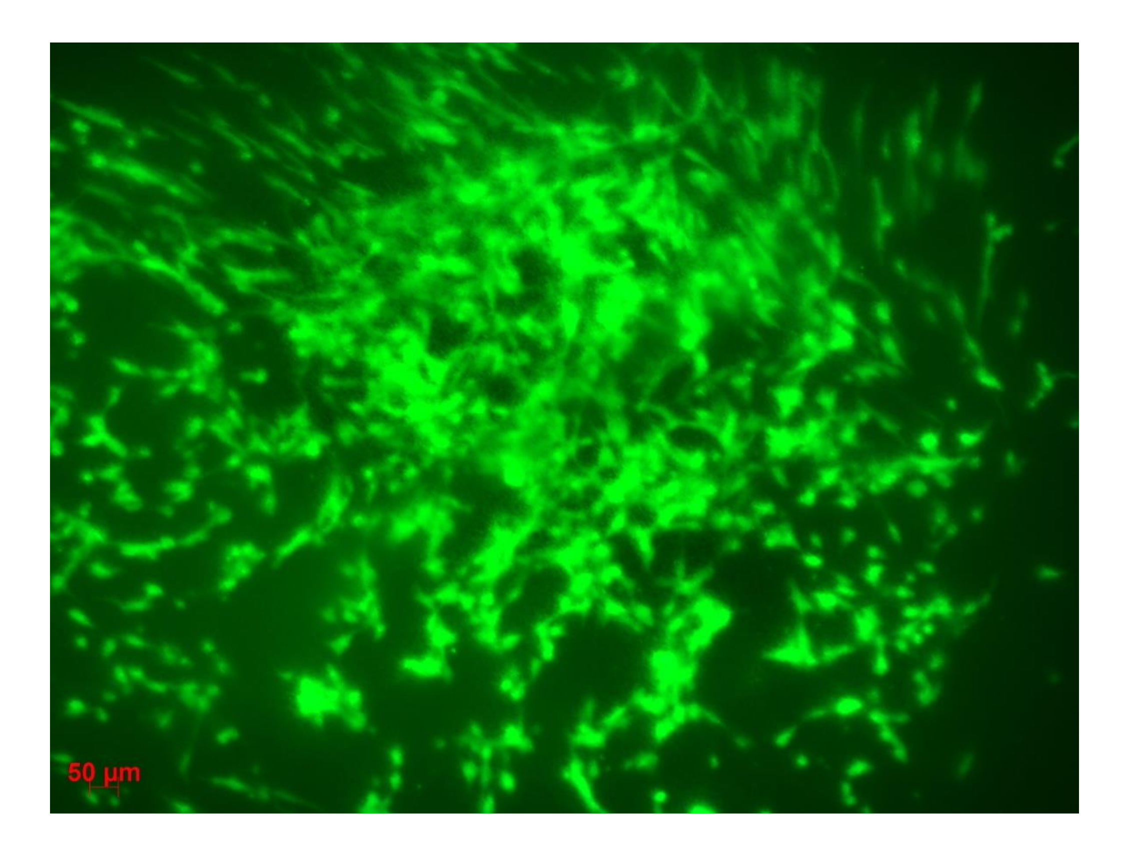


Fig.22. Aspectul celulelor de glioblastom HTB14 transfectate cu GFP la 48 de ore de la injectare. Se observa aparitia fenotipului infiltrativ la nivelul populatiei celulare periferice

La o marire mai mare a imagini (Obiectiv x20) se poate observa fenotipul infiltrativ elongat caracteristic al celulei tumorale migratorii periferice (Fig.23)

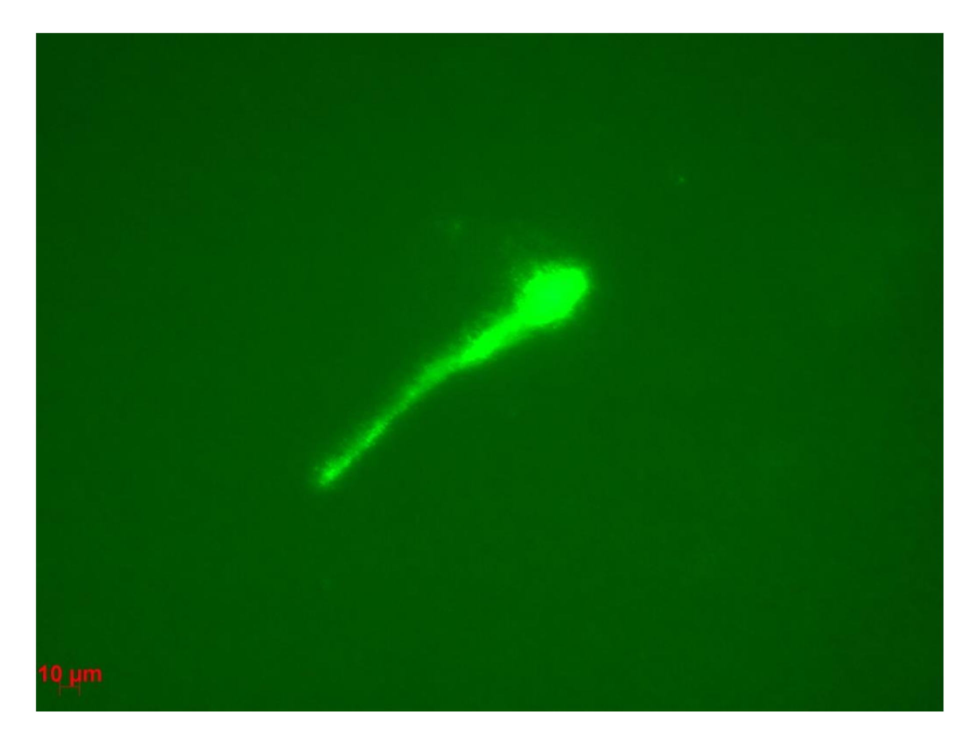


Fig.23. Aspectul caracteristic al unei celule de glioblastom marcata GFP infiltrativa

La 7 zile de la injectare proliferare si migrarea celulelor de glioblastom sunt evidente, avand tendinta sa invadeze intreaga sectiune celulara (Fig.24).

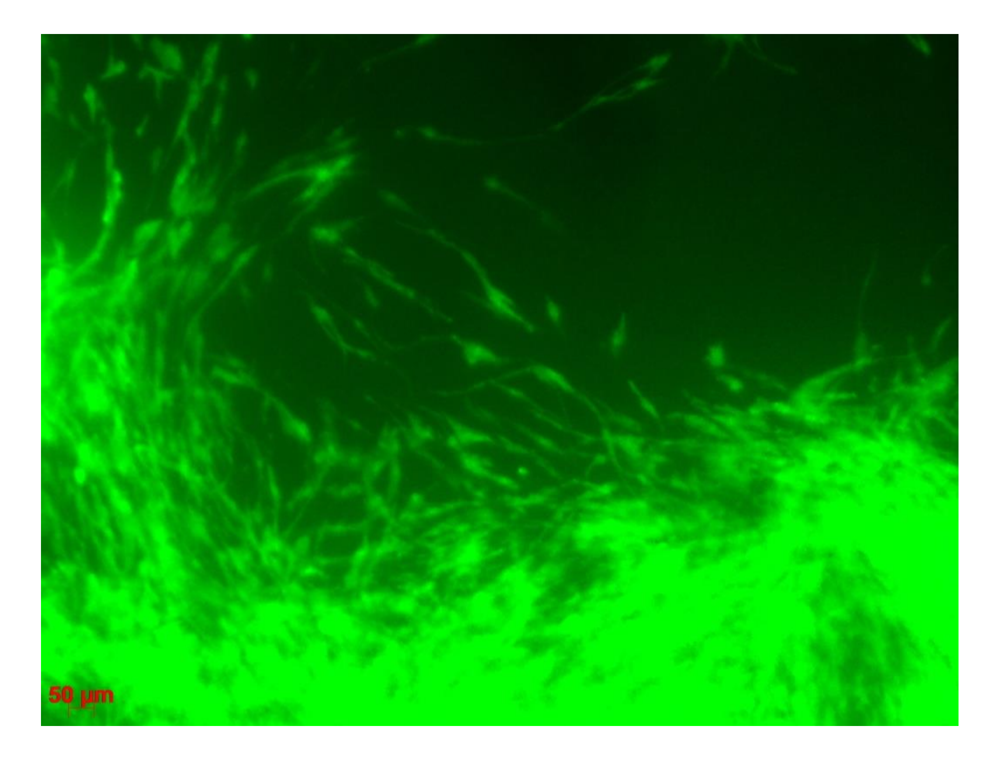


Fig.24. Aspectul celulelor de glioblastom HTB14 transfectate cu GFP la 48 de ore de la injectare

In urma experimentelor efectuate, am realizat obiectivul I al acestei etape. Mai mult, prin modificarea si adaptarea protocoalelor existente in literatura am reusit sa obtinem un model experimental eficient, ce permite monitorizarea si inregistrarea proliferarii si migrarii celulelor de glioblastom.

Obiectiv 2. Blocarea genelor/moleculelor tinta implicate in invazia glioamelor – evaluare prin tehnica „scrape migration assay”:

Activitate 2.1. Blocarea genelor/moleculelor tinta in liniile de glioblastom si in culturile primare de glioblastom

Aceasta activitate a fost realizata de catre subcontractorul Institutul de Patologie Celulara i Moleculara "Nicolae Simionescu" si a cuprins urmatoarele experimente: 1. Obtinerea celulelor din linia HTB-14 care supraexprima gena reporter GFP (HTB-14-GFP) si 2. Obtinerea celulelor din linia HTB-14 care supraexprima gena reporter GFP si nu exprima gena LIS1 (HTB-14-GFP-shLis).

1. Obtinerea celulelor din linia HTB-14 care supraexprima gena reporter GFP (HTB-14-GFP).

Obtinerea acestei linii celulare modificate genetic a fost realizata prin transfectia celulelor HTB-14 cu plasmide care contin gena GFP. Celulele HTB-14 au fost cultivate in mediu DMEM cu 4.5%o glucoza, suplimentat cu ser fetal bovin (10%) si antibiotic (penicilina, streptomicina si neomicina). In vederea transfectarii, celulele au fost pasate prin tripsinizare in placi de plastic de 5 cm diametru la o densitate de 105celule/cm2. Plasmidele care codifica gena pentru GFP (Fig. 25) au fost procurate de la firma Clontech, amplificate in bacterii DH5 si purificate folosind in kit de midiprep de la firma Quiagen. ADN-ul obtinut a fost cuantificat prin spectrofotometrie si a fost diluat pana la concentratia de 1mg/ml. Puritatea ADN-ului a fost verificata prin raportul DO260/DO280. S-au obtinut valori ale raportul DO260/DO280 intre 1.8 si 2.0.

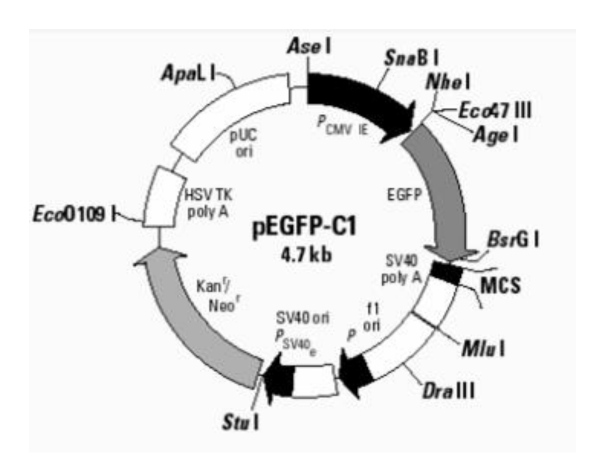


Fig25. Plasmida care codifica pentru GFP.

Transfectia celulelor a fost realizata prin lipofectie, utilizand lipofectamina (Invitrogen), urmarind protocolul furnizorului. Astfel, au fost preparate complexe ADN-liposomi utilizand 5μg ADN si 20μL Lipofectamina, intr-un volum de 500 μL Optimem (Invitrogen). Dupa 48h de la transfectie, mediul a fost schimbat cu mediu proaspat. Apoi, timp de 30 de zile, celulele au fost cultivate in concentratii crescatoare de geneticin 418 (G418), pentru selectia celulelor transfectate. Pe scurt, mediul a fost schimbat de 2 ori pe saptamana, cu concentratii de G418 incepand 400 si ajungand la 1000 μg/ml. In final au fost obtinute cateva linii stabile de celule HTB14-GFP, dintre care s-a ales o linie care exprima mai puternic GFP, asa cum se observa din Fig 26.

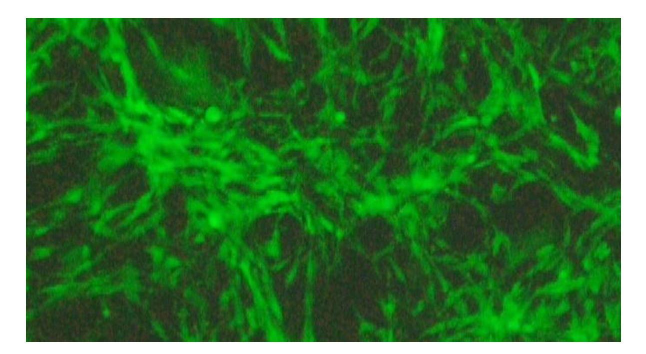


Fig 26. Microscopie optica de fluorescenta pentru vizualizarea celulelor HTB-14care exprima GFP. Se observa distributia celulara a proteinei fluorescente.

Obtinerea celulelor din linia HTB-14 care supraexprima gena reporter GFP si nu exprima gena LIS1 (HTB-14-GFP-shLis). In vederea obtinerii liniei celulare HTB-14-GFP-shLIS1, celulele HTB-14-GFP au fost transfectate cu plasmide care contin shRNA pentru gena LIS1. Celulele HTB-14-GFP au fost cultivate in mediu DMEM cu 4.5%o glucoza, suplimentat cu ser fetal bovin (10%) si antibiotic (penicilina, streptomicina si neomicina). In vederea transfectarii cu plasmidele continand shLis, celulele au fost pasate prin tripsinizare in placi de plastic de 5 cm diametru la o densitate de 105celule/cm2. In vederea transfectiei, celulele au foost cultivate in DMEM tamponat cu HEPES și bicarbonat de sodiu, și suplimentat cu hipoxantină, timidină, piruvat de sodiu, L-glutamină, oligoelemente și factori de creștere; in mediul de cultura pentru transfectie nivelul de proteine este minim - insulina și transferina fiind singurele suplimente proteice (SantaCruz -Plasmid Transfection Medium sc-108062). Plasmidele folosite pentru inhibarea expresiei genei Lis1 contin 3 tipuri de shRNA specific pentru pentru LIS1, clonate intr-un vector lentiviral. Fiecare secventa de shRNA contine 19-25 nucleotide avand o structura in „ac de par” – ceea ce conduce la

blocarea expresiei genei respective – figura alaturata. Plasmidele cu shLis contin o genă de rezistență la puromicină pentru selectarea celulelor care exprimă stabil shRNA. Transfectia a fost realizata cu reactivul Plasmid Transfection Reagent sc-108061, de la Santa Cruz, urmarind protocolul furnizorului. Astfel, 2 µg plasmida shLis au fost dizolvate in 200 µl (volum final) mediu sc-108062, iar reactivul de transfectie (1-6 µl) a fost diluat in 200 µl (volum final) mediu sc-108062. Amestecul obtinut intre solutia de plasmide si reactivul de transfectie a fost adaugata peste celulele HTB-14-GFP spalate si cultivate in mediu sc-108062. Dupa 48 de ore de la transfectie a fost schimbat mediul si a fost adaugata puromicina in concentratie finala de 0.5-2 µg/ml. Puromicina este un antibiotic care inhiba siteza proteica in celulele care nu sunt transfectate si nu au gena puromycin N-acetyl-transferazei – care le confera rezistenta. Au fost izolate clone de celule rezistente la geneticina si puromicina (Fig.27). Testarea prin Real Time folosind sonde specifice a aratat o diminuare drastica a expresiei genei Lis1 in celulele transfectate cu shLis.

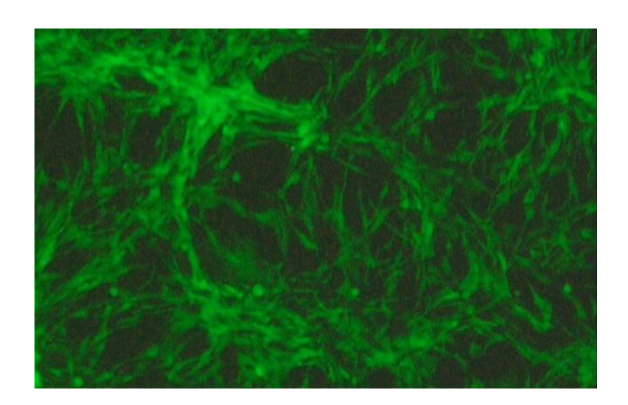


Fig 27. Microscopie optica de fluorescenta pentru vizualizarea celulelor HTB-14care exprima GFP si nu exprima gena Lis1.

Activitate 2.2. Evaluarea eficientei inhibarii migrarii prin tehnica „scrape migration assay” (migrare pe suprafata, in 2 dimensiuni).

Pentru efectuarea experimentelor din cadrul Activitatii 2.2 a proiectului, am utilizat linia celulara HTB14 (U87). Celulele transfectate cu GFP- shLIS1-in cadrul activitatii 2.1 au fost cultivate in placi de cultura cu 6 godeuri. Aceste celule au o expresie diminuata a genei LIS1. Ca martor a fost utilizata aceiasi linie transfectata doar cu gena de expresie a proteinei GFP. S-au recoltat atat celulele shLIS1-GFP cat si cele martor GFP, prin tripsinizare. Ambele tipuri de celule au fost insamantate la o densitate de 1 milion celule/ml. Cultivarea celulelor s-a facut cu mediu DMEM imbogatit cu glutamina, ser fetal 15% si antibiotic 1%., in incubator la 37 grade C si mediu umidificat si imbogatit cu CO_2 5%. Dupa 48 de ore de la insamantare s-a realizat testul numit "scrape migration assay". Acesta este un test simplu ce evalueaza invazia celulelor pe suprafata placii de cultura. Se practica o stergere a suprafetei de cultura cu un instrument bont, steril cu diametru de 3 mm, pentru fiecare godeu in parte. Imaginile sunt inregistrate la momentul t0, si apoi la 1,2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 si 24 de ore si comparate pentru a se analiza ritmul de migrare al celulelor si de repopulare a portiunii de pe suprafata placii de cultura din care au fost indepartate celulele. Prezentam mai jos comparativ ritmul de migrare la 3 momente: t0, 12 si 24 de ore pentru celulele martor GFP si celulele shLIS1-GFP. Imaginile au fost achizitionate la microsopia optica, in contrast de faza cu obiectiv x5 (Fig.28).

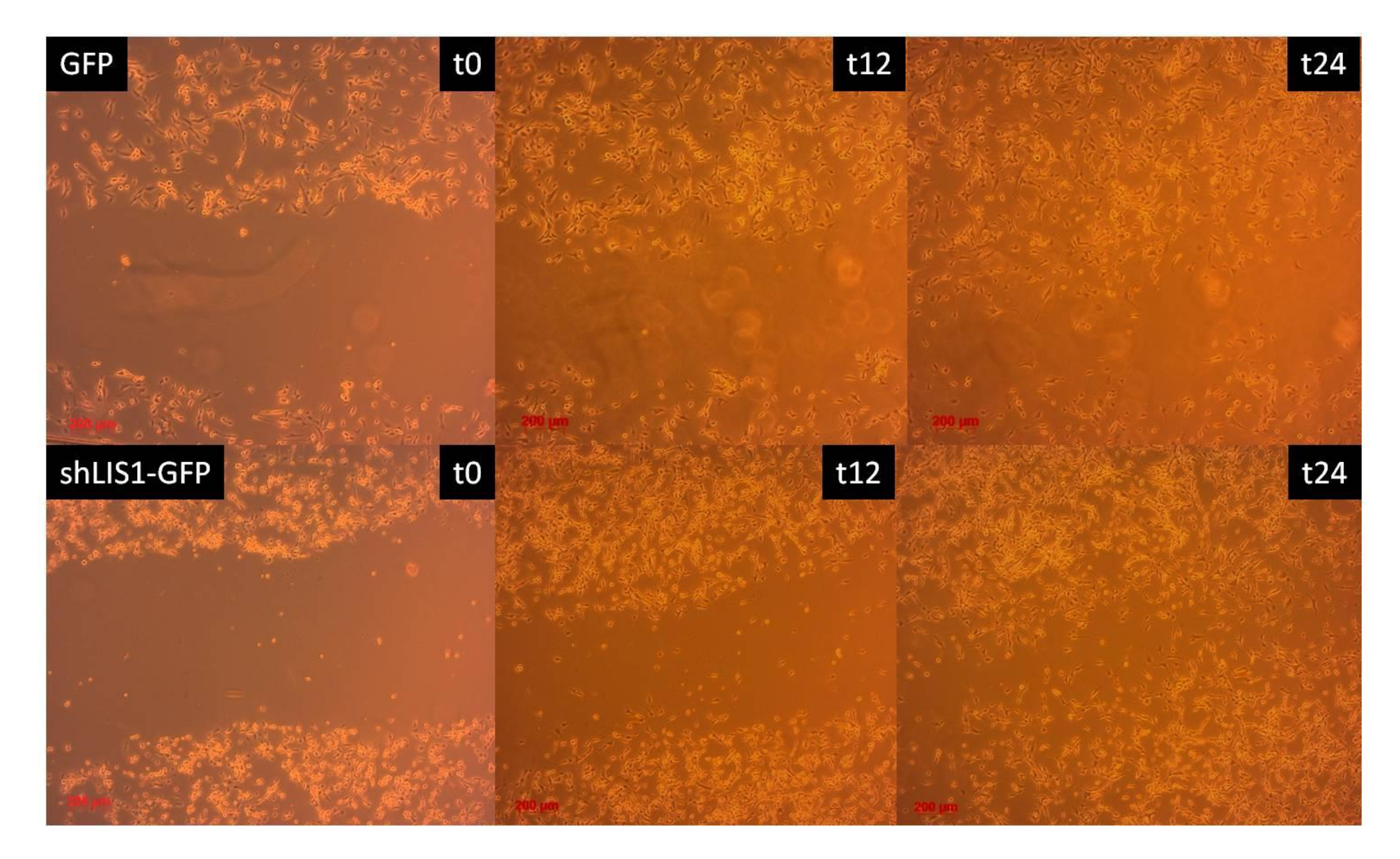


Fig.28. Testul "scrape migration assay" pentru HTB14 GFP (sus) si pentru HTB14 shLIS1-GFP (jos) la 3 momente: t0, si la 12 si 24 de ore de la momentul t0.

La o analiza preliminare a rezultatelor se poate observa un usor avantaj pentru celulele transfectate shLIS1-GFP fata de martor din punct de vedere al migrarii si al vitezei de repopulare a zonei de "scrape". Se poate observa cum la 24 de ore, culturile cu shLIS1 au repopulat aproape in totalitate zona de "scrape", in timp ce pentru celulele martor GFP se mentine zona distincta acelulara.

Etapa III

III. In cadrul etapei III a proiectului cu titlul „A new anti-invasive experimental strategy for infiltrative malignant gliomas", cod proiect PN-II-RU-TE-2012-3-0235, au fost indeplinite urmatoarele obiective propuse in planul de realizare al proiectului:

Obiectiv 1. Blocarea genelor/moleculelor tinta implicate in invazia glioamelor – evaluare prin tehnica „transwell migration assay":

- Activitate 1.1. Blocarea genelor/moleculelor tinta in liniile de glioblastom si in culturile primare de glioblastom

- Activtate 1.2. Evaluarea eficientei inhibarii migrarii prin tehnica „transwell migration assay" (migrare in spatiu tridimensional)

2. Blocarea genelor/moleculelor tinta implicate in invazia glioamelor – evaluare prin utilizarea noului model experimental dezvoltat in etapele anterioare

- Activitate 2.1. Blocarea genelor/moleculelor tinta in liniile de glioblastom si in culturile primare de glioblastom

- Activitate 2.2. Inocularea liniilor si a culturilor primare de glioblastom cu potential invaziv redus la nivelul sectiunilor tisulare

- Activitate 2.3. Evaluarea eficientei inhibarii migrarii prin utilizarea noului model experimental-monitorizarea migrarii celulelor tumorale prin microscopia in fluorescenta

Activitate 1.1. Blocarea genelor/moleculelor tinta in liniile de glioblastom si in culturile primare de glioblastom

Obtinerea celulelor din linia HTB-14 care nu exprima gena LIS1 (shLis HTB-14).

In vederea obtinerii liniei celulare shLIS1 HTB-14 celulele HTB-14 au fost cultivate in mediu DMEM cu 4.5‰ glucoza, suplimentat cu ser fetal bovin (10%) si antibiotic (penicilina, streptomicina si neomicina). In vederea transfectarii cu plasmidele continand shLis, celulele au fost pasate prin tripsinizare in placi de plastic de 5 cm diametru la o densitate de 10^5celule/cm^2. Inainte de transfectie, mediul de cultura a fost shimbat mediul pentru transfectie, in care nivelul de proteine este minim - insulina și transferina fiind singurele suplimente proteice (SantaCruz -Plasmid Transfection Medium sc-108062). Plasmidele folosite pentru inhibarea expresiei genei Lis1 contin 3 tipuri de shRNA specific pentru pentru LIS1, clonate intr-un vector lentiviral. Fiecare secventa de shRNA contine 19-25 nucleotide avand o structura in „ac de par” – ceea ce conduce la blocarea expresiei genei respective – figura alaturata (http://www.scbt.com/gene_silencers.html). Plasmidele cu shLis contin o genă de rezistență la puromicină pentru selectarea celulelor care exprimă stabil shRNA. Mecanismul inhibitiei expresiei genice este redat in Figura 29. Transfectia a fost realizata cu reactivul Plasmid Transfection Reagent sc-108061, de la Santa Cruz, urmarind protocolul furnizorului. Astfel, 2 µg plasmida shLis au fost dizolvate in 200 µl (volum final) mediu sc-108062, iar 6 µl din reactivul de transfectie au fost diluati in 200 µl (volum final) mediu sc-108062. Amestecul obtinut intre solutia de plasmide si reactivul de transfectie a fost adaugata peste celulele HTB-14 spalate si cultivate in mediu sc-108062. Dupa 48 de ore de la transfectie a fost schimbat mediul si a fost adaugata puromicina in concentratie finala de 1µg/ml. Puromicina este un antibiotic care inhiba siteza proteica in celulele care nu sunt transfectate si nu au gena puromycin N-acetyl-transferazei – care le confera rezistenta. Dupa 2 saptamani au fost izolate clone de celule rezistente la geneticina si puromicina. Dupa obtinerea liniilor stabile a fost testata capacitatea celulelor transfectate cu plasmide pentru shLis de a forma neurosfere in mediu stem. In mediu de cultura normal (DMEM suplimentat cu 10% ser), celulele HTB-14 transfectate prezinta un aspect similar cu al celulelor normale (Fig. 30a). In mediu specific celulelor stem neurale (denumit in continuare mediu stem): DMEM/F12: Neurobazal Mediu suplimentat cu 10ng/ml FGF; 20 ng /ml EGF, B27 x1 si N2 x1, celulele transfectate formeaza retele (Fig. 30b) si apoi neurosfere (Fig. 30c), in mod asemanator celulelor netransfectate HTB-14.

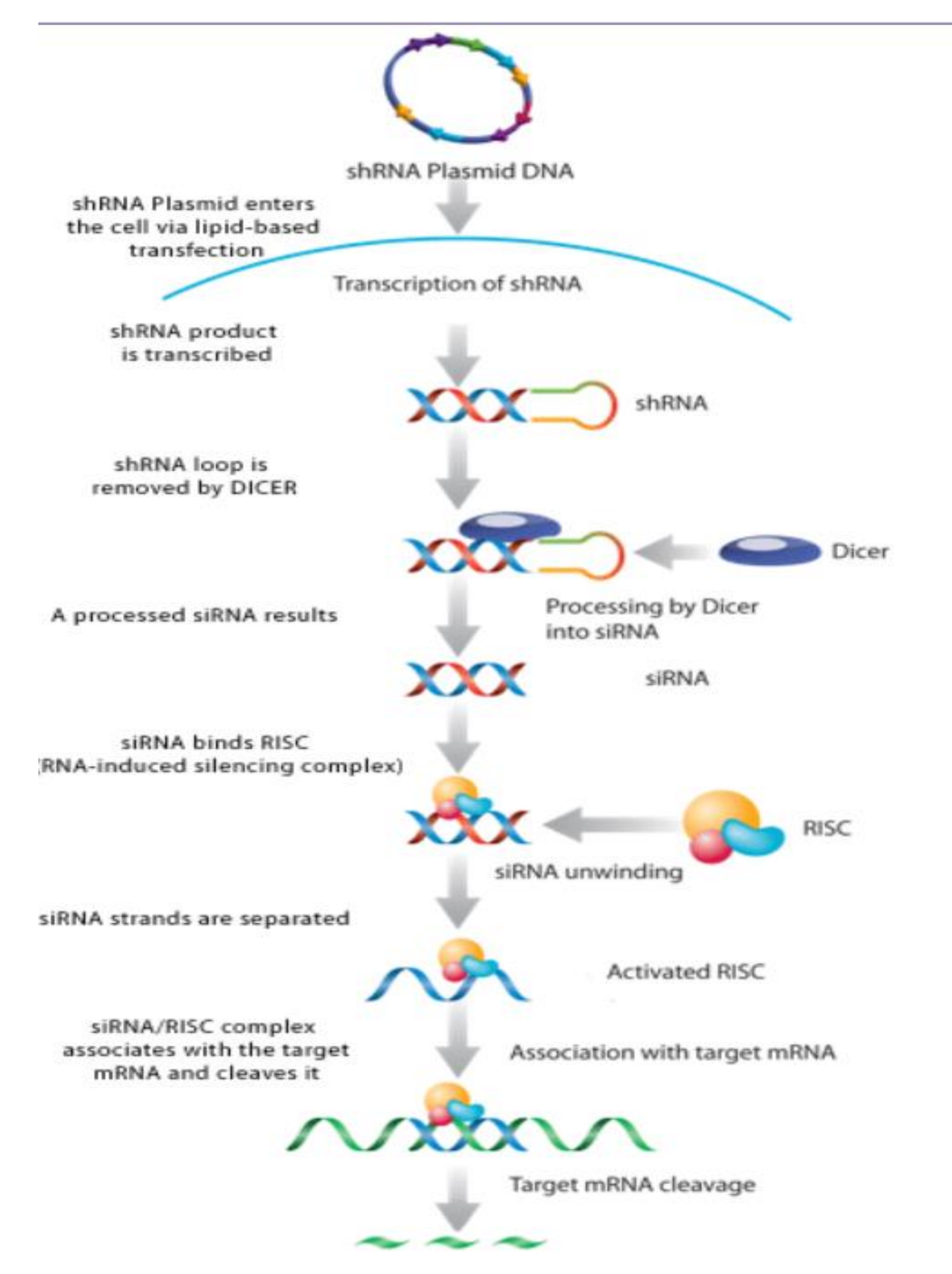


Fig 29. Mecanismul inhibarii expresiei genice a shLis prin transfectie.

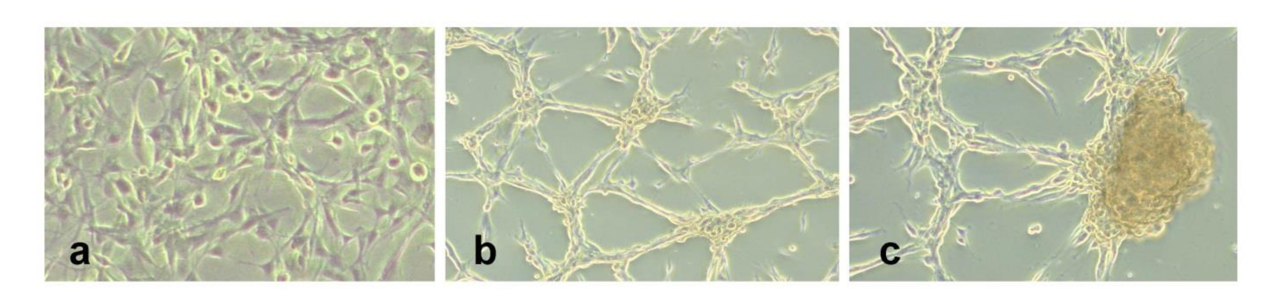


Fig 30. Aspectul morfologic al celulelor transfectate cu plasmide pentru shLis si capacitatea acestora de a forma neurosfere in mediu stem. In mediu de cultura normal (DMEM suplimentat cu 10% ser) celulele HTB-14 transfectate prezinta un aspect similar cu al celulelor normale (a). In mediu specific celulelor stem neurale: DMEM: Neurobazal Mediu suplimentat cu 10ng/ml FGF; 20 ng /ml EGF, B27 x1 si N2 x1, celulele transfectate formeaza retele (b) si apoi neurosfere (c).

In linia celulara glioblastoma HTB-14 transfectata cu shLis testarea inhibarii expresiei genei Lis1 a fost realizata prin Real Time folosind sonde TaqMan. Deoarece expresia Lis1 este indusa in celulele de glioblastoma, in special in celulele CD133 pozitive, am supus celulele transfectate tratamentului cu mediu pentru celule stem neurale (descries mai sus) pentru 3 zile si apoi am izolat celulele CD133 pozitive folosind CD133 MicroBead Kit de la Miltenyi Biotec. Molecula CD133 este un antigen de suprafață cu o greutate moleculară de 117 kD, iar anticorpul funizat in kit

recunoaste un epitop al CD133, iar prin legarea de particulele coloanei de separare se realizeaza selectia pozitiva a celulelor CD133 pozitive. Pentru aceasta izolare, neurosferele formate din celulele HTB-14 sau shLis HTB-14 au fost disociate cu 2-3 ml Liberaza (Roche), preparata astfel: 200µl solutie Liberaza 2.5mg/ml a fost diluata la 15 ml mediu DMEM. Celulele disociate au fost centrifugate 5 min la 300g si supernatantul a fost aspirat complet. Sedimentul de celule a fost resuspendat în 300µl de tampon tampon fosfat continand 0.5% albumina bovina si 2mM EDTA pe 10^8 celule, dupa care s-au adaugat 100 µl de reactiv de blocare si 100 µl de microsfere cu CD133. Dupa incubare 30 min pe gheata (2-8 °C), celulele au fost spălate prin adăugarea 1-2 ml de soluție pe 10^8 celule și centrifugarea la 300g timp de 10 minute. Supernatantul a fost aspirat complet si celulele au fost resuspendate în 0.5ml tampon. Coloanele de separare au fost spalate cu 0.5ml tampon si apoi suspensia celulara a fost trecuta pe coloana plasata pe suportul magnetic, iar celulele care nu prezentau antigen CD133 au fost eluate. Celulele CD133 pozitive au fost eluate dupa indepartarea coloanei de pe suportul magnetic si colectate in 0.5ml tampon. Dupa centrifugarea celulelor, peste sediment s-a adaugat 0.5ml Trizol, iar ARN a fost izolat dupa protocolul furnizat de producator. Concentratia probelor de ARN a fost evaluata prin citirea densitatii optice la 260nm la spectrofotometrul Nanodrop. Calitatea ARN izolat a fost evaluata prin determinarea raportului DO260/DO280. Toate probele au avut rapoarte cuprinse intre 1.8-2, ceea ce indica o puritate foarte buna a ARN izolat. Reverstranscrierea ARN in cDNA a fost realizata folosind MMLV si oligodT (Invitrogen) si 1µg ARN, intr-un volum final de 50 µl. Analiza Real Time PCR a fost realizata folosind TaqMan® Gene Expression Assays (Invitrogen) pentru Lis1 (gena denumita si PAFAH1B1- Assay ID: Hs00181182_m1). Sondele pentru Lis1 au fost marcate cu FAM, iar pentru GAPDH (control endogen) au fost marcate cu VIC. Amestecul de reactie a continut 1 µl cDNA, 5µl TaqMan® Universal Master Mix II, cu UNG (concentrate x2, Invitrogen), 1 µl primeri si sonda si 3 µl apa. Pipetarea probelor in placa cu 384 godeuri s-a efectuat cu ajutorul pipetorului automat Qiagility (Qiagen), folosind varfuri conductive de 50µl. Programul de amplificare: 2min, 50°C; 10 min, 95°C; urmat de 40 cicluri: 15sec, 95°C si 1min, 60°C a fost realizat in aparatul 7900HT System de la Applied Biosystem. Rezultatele obtinute in programul SDS2.4, au fost prelucrate folosind un Software de analiza RQ Manager. Rezultatele prezentate in Figura 31 au aratat ca in celulele transfectate cu shLis, expresia genica a Lis nu a putut fi indusa in celulele CD133 pozitive, prin incubarea celulelor cu mediu pentru celule stem neurale, asa cum a fost indusa in celulele control, HTB-14 netransfectate.

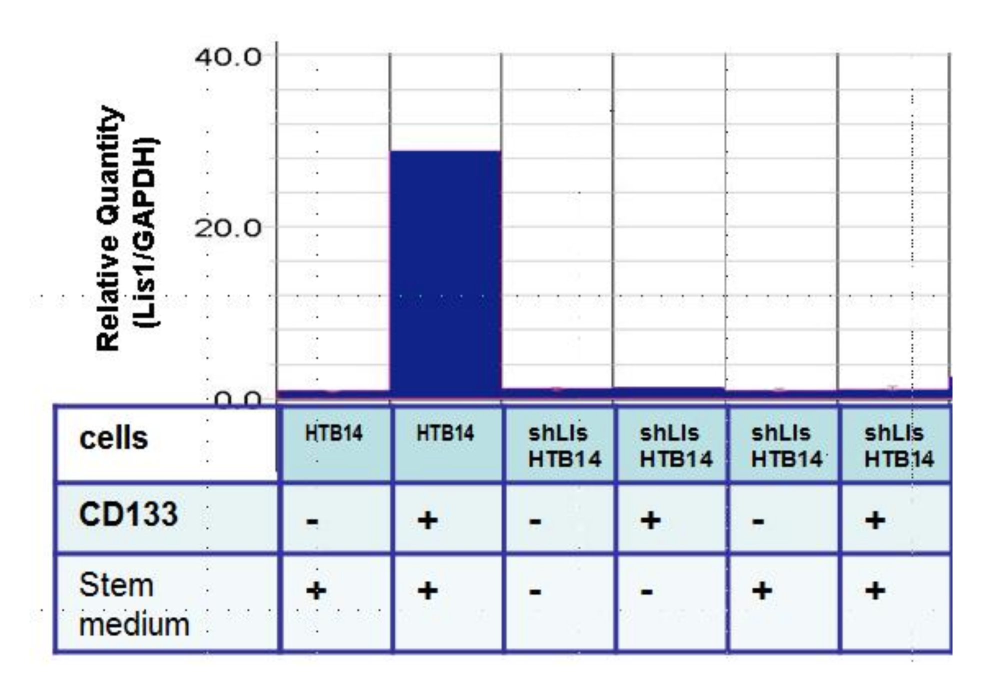


Fig 31. Expresia Lis1 determinata prin experimente de Real Time PCR in celulele CD133 negative si pozitive, izolate din liniile HTB14 si shLis HTB14, crescute in mediu normal sau incubate cu mediu stem. Se observa incapacitatea inducerii expresiei Lis in celulele transfectate cu shLis (shLis HTB14).

De asemenea, s-a evaluat potentialul celulelor transfectate cu shLis de a produce celule CD133 pozitive. Celulele din linia HTB14 si celulele transfectate cu shLis au fost incubate pentru 24 si 48 ore cu mediu stem descris mai sus. Apoi s-a izolat ARN care s-a reverstranscris in cDNA. Produsii de reactive obtinuti pentru CD133 si GAPDH

(control endogen) au fost migrati pe gel de agaroza, iar marimea benzilor a fost determinata cu ajutorul soft-ului TotalLab. Rezultatele illustrate in figura 32 arata ca, spre deosebire de linia HTB-14, in celulele in care nu se poate induce expresia Lis1 prin cultivare pe medii stem (celulele transfectate cu shLis), nu se induce nici expresia CD133.

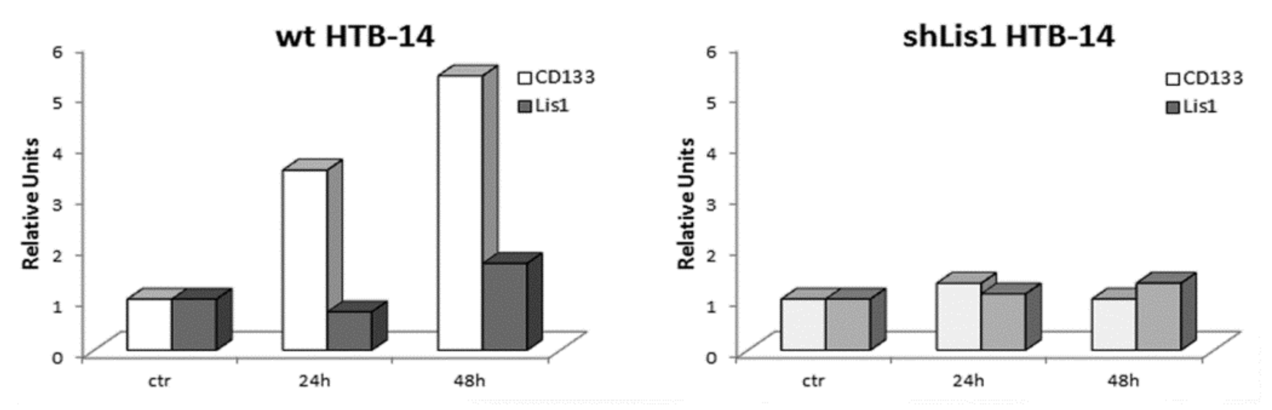


Fig 32. Expresia CD133 in celulele HTB-14 si in celulele transfectate cu shLis (shLis HTB-14).

Expresia CD133 in neurosfere formate din celulele HTB14 a fost evidentiala prin microscopie de fluorescenta. Pe scurt, celulele HTB-14 au fost crescute pe lamele de sticla in medii stem pentru 3 zile si apoi fixate prin incubare cu methanol timp de 5min la 4°C. Dupa uscare, lamele s-au hidratat in tampon fosfat salin si apoi s-au incubat cu o solutie de 10% ser de capra pentru 1 ora. Probele au fost incubate cu anticorpul primar anti CD133, spalate cu tampon fosfat salin cu 5% albumina serica bovina si apoi cu anticorpul secundar marcat cu Alexa Fluor® 488. Colorarea nucleilor a fost realizata cu Hoechst 33342 (Fig 33b). Rezultatele arata ca celulele CD133 pozitive (Fig 33a) apar exclusive in aglomerarile celulare ale neurosferelor. In figura 33c este redata suprapunerea imaginilor preluate pentru CD133 si pentru nuclei.

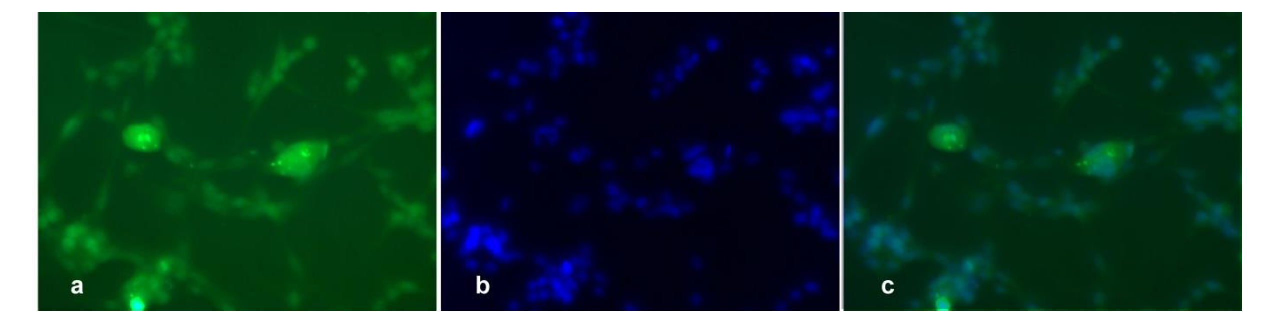


Fig 33. Expresia CD133 in celulele HTB14 incubate cu mediu stem. Punctele luminoase verzi din (a) reprezinta expresia CD133, nuclei sunt colorati in albastru cu Hoechst 33342 (b), iar supreapunerea celor doua imagini (c) arata localizarea CD133 pe celulele din neurosfere.

Se poate concluziona ca, desi inhibitia expresiei genice a Lis1 in celulele HTB14 nu impiedica formarea neurosferelor in medii stem, aceste linii de glioblastom au potential invaziv redus, deoarece inducerea celulelor stem CD133 pozitive este redusa.

Activitate 1.2. Evaluarea eficientei inhibarii migrarii prin tehnica „transwell migration assay" (migrare in spatiu tridimensional)

In vederea evaluarii migrarii celulelor HTB-14 si celulelor transfectate shLis HTB14, s-au efectuat initial experimente de proliferare utilizandu-se sistem de monitorizare xCELLigence. Acest sistem permite monitorizarea in timp real a viabilitatii celulare. Sistemul xCELLigence utilizează plăci de microtitrare special concepute care conțin microelectrozi de aur interdigitati care permit monitorizarea noninvaziva a viabilitatii celulelare, prin citirea impedantei electrice. Prezența celulelor pe electrozi afecteaza mediul ionic local la interfața electrod / solutie, ceea

ce duce la o creștere a impedantei. Cu cat mai multe celule sunt atașate pe electrozi, cu atât impedanta va creste mai mult, asa cum e ilustrat schematic in fig. 34. În plus, impedanța depinde de calitatea interacțiunii celulă cu electrozii. Astfel, impedanta care este afișata ca valori ale indicelui celular (CI), poate fi folosita pentru a monitoriza viabilitatea celulara, numărul, morfologia, și gradul de adeziune.

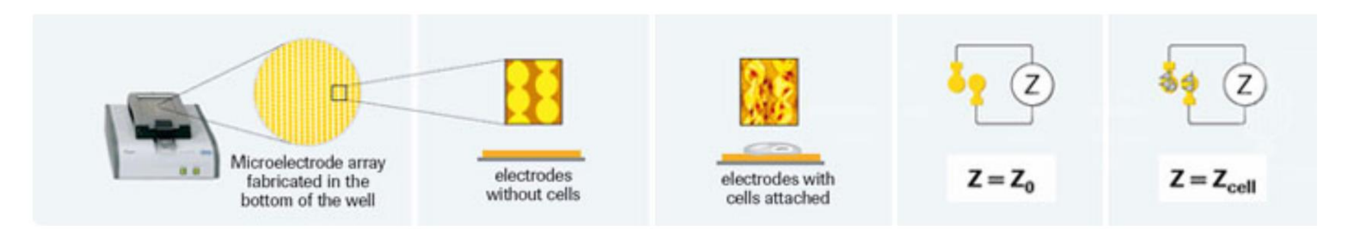


Fig 34. Principiul tehnologiei xCELLigence. Instrumentul RTCA DP prezentat in stanga, masoara diferentele de impedanta datorate marimii suprafetelor microelectrozilor acoperiti de celulele in proliferare. http://www.aceabio.com/theory.aspx?cateid=398

In experimentele noastre am folosit determinarea indicelui celular prin monitorizarea continuă a viabilității prin xCELLigence. Celulele din linia HTB14 au fost cultivate pe randul 1 si celulele transfectate shLisHTB14 au fost cultivate pe randul 2. Incubarea a fost facuta cu DMEM cu 10% ser fetal (A,B,C), cu DMEM/F12 cu 10% ser fetal (D,E) sau cu mediu stem (F,G,H). Rezultatele arata o rata de proliferare mai mare in cazul mediului DMEM /F12 comparativ cu mediul DMEM, pentru ambele tipuri celulare. Se remarca o diminuare a indexului celular in cazul celulelor transfectate cu shLis, atat in mediu DMEM (magenta) cat si in mediuDMEM/F12 (verde) comparative cu celulele HTB14 in mediu DMEM (rosu) si respective mediu DMEM/F12 (albastru) Ambele tipuri celulare au rata de proliferare aproape nulain mediu stem (bleu si bleumarin) (Fig.35).

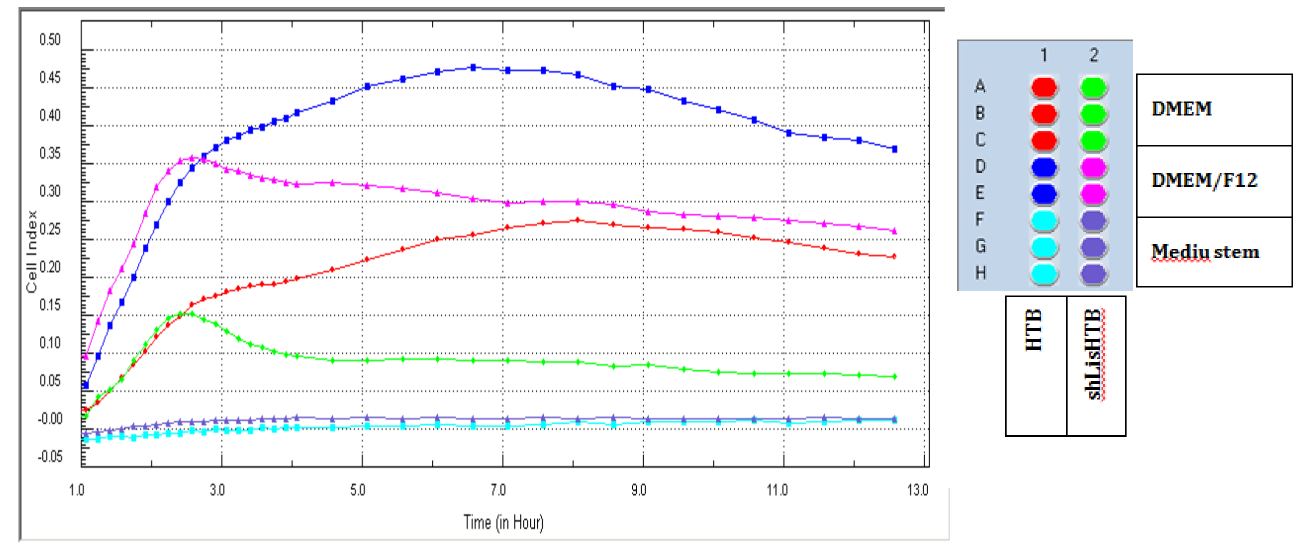


Fig 35. Proliferarea celulelor HTB14 si shLisHTB14 in difertite medii de cultura inregistrata cu sistemul xCELLigence. Celulele din linia HTB14 au fost cultivate pe randul 1 si celulele transfectate shLisHTB14 au fost cultivate pe randul 2. Rata de proliferare este mai mare in cazul mediului DMEM /F12 comparativ cu mediul DMEM, pentru ambele tipuri celulare. In cazul celulelor transfectate cu shLis se remarca o diminuare a indexului celular atat in mediu DMEM (magenta) cat si in mediu DMEM/F12 (verde) comparative cu celulele HTB14 in mediu DMEM (rosu) si respective mediu DMEM/F12 (albastru) Ambele tipuri celulare au rata de proliferare aproape nulain mediu stem (bleu si bleumarin).

In continuare am realizat experimente de migrare a celulelor cu ajutorul placilor CIM ale sistemului xCELLigence. Placa CIM are două secțiuni separabile. Celulele însămânțate în camera superioară se deplaseaza prin suprafata microporoasă în camera inferioară care conține un chemoatractant, in cazul nostru serul sau mediul stem.

Celulele care aderă la senzorii microelectrozilor duc o crestere a impedanței, care este măsurată în timp real de către Instrumentul RTCA DP, asa cum este ilustrat schematic in figura 36.



Fig 36. Principiul tehnologiei xCELLigence pentru experimentele de migrare celulara. Celulele atrase de factorii existenti in compartimentul inferior, patrund prin porii din peretele inferior al compartimentului superior. Instrumentul RTCA DP indexul cellular al celulelor care trec dintr-un compartiment in celalalt. http://www.aceabio.com/theory.aspx?cateid=398

Pentru evaluarea migrarii celulelor HTB14 comparativ cu celulele shLisHTB14, celulele au fost cultivate in DMEM/F12 fara ser in compartimentul superior (pe randul 3 – celulele HTB14 si pe randul 4 celulele shLisHTB14). In compartimentul inferior a fost adaugat mediu DMEM/F12 fara ser (A, B) sau mediu DMEM/F12 cu 10% ser (C, D) sau mediu stem (E-H). Rezultatele prezentate in Fig 37 arata o rata mai scazuta a migrarii in cazul celulelor shLisHTB14 (magenta) comparativ cu celulele HTB14 (albastru) in cazul in care in compartimentul inferior a fost mediu DMEM/F12 cu 10% ser. Desi mediul stem nu a indus o migrare importanta, totusi se observa si in acest caz o diminuare a migrarii in cazul celulelor shLisHTB14 (albastru inchis E4F4G4H4) comparativ cu celulele HTB14 (albastru deschis E3F3G3H3).

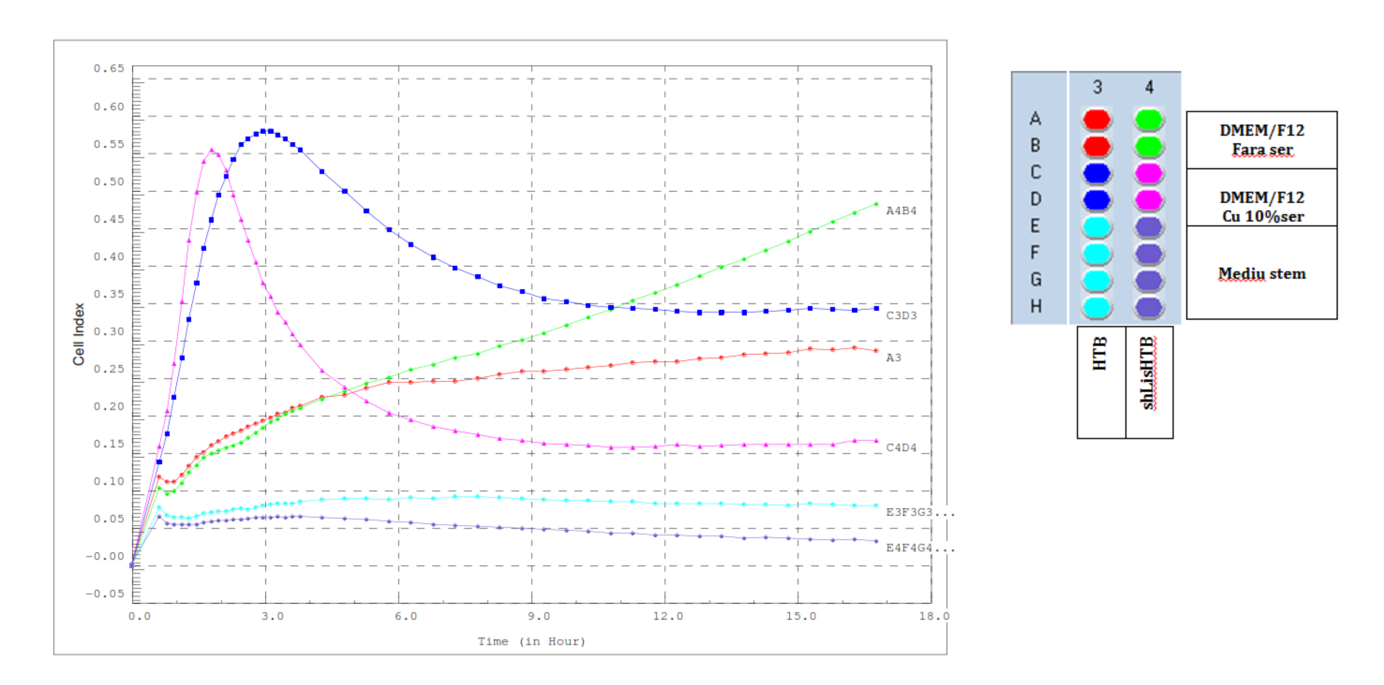


Fig 37. Migrarea celulelor HTB14 si shLisHTB14. Celulele din linia HTB14 au fost cultivate pe randul 3 si celulele transfectate shLisHTB14 au fost cultivate pe randul 4. Se remarca o rata mai scazuta a migrarii in cazul celulelor shLisHTB14 (magenta C4D4) comparativ cu celulele HTB14 (albastru C3D3) in cazul in care in compartimentul inferior a fost mediu DMEM/F12 cu 10% ser. Desi mediul stem nu a indus o migrare importanta, totusi se observa si in acest caz o diminuare a migrarii in cazul celulelor shLisHTB14 (albastru inchis E4F4G4H4) comparativ cu celulele HTB14 (albastru deschis E3F3G3H3).

Activitate 2.1. Blocarea genelor/moleculelor tinta in liniile de glioblastom si in culturile primare de glioblastom

Pentru acest obiectiv am realizat culturi primare pronind de la material tumoral recoltat steril. Acesta a fost maruntit si eventualele cheaguri de sange au fost indepartate. Suspensia a fost trecuta prin site cu mesh de 50µm. Celulele au

fost separate prin tripsinizare timp de 5min la temperature camerii, centrifugate 5 min la 200g si insamantate in meiu DMEM/F12 cu 10% ser. A doua zi, mediul a fost schimbat si debriurile celulare au fost indepartate. Din cele 6 probe tumorale, numai din 3 s-au putut stabili linii celulare notate cu HTU1, HTU5 si HTU6. Toate aceste linii celulare au fost testate pentru capacitatea lor de a forma neurosfere in medii stem, insa la pasajul 2-4, nici una nu a format neurosfere. Totusi, tratamentul cu mediu stem a indus expresia CD133. Dupa separarea celulelor CD133 pozitive, s-a determinat expresia Lis1 in aceste celule isolate din HTU5 si HTU6 si celulele din linia HTB14. Rezultatele illustrate in fig 38 arata o crestere spectaculoasa a expresiei Lis1 in celulele CD133 izolate din HTU5 si HTU6, la fel ca si cele isolate din celulele HTB14. Expresia Lis a fost inhibata prin transfectie cu shLis, asa cum a fost descris la obiectivul anterior.

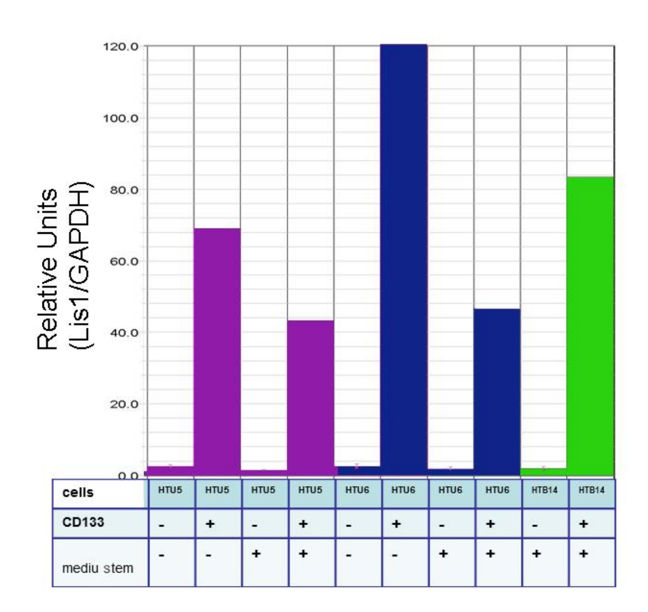


Fig 38. Expresia Lis1 determinata prin experimente de Real Time PCR in celulele CD133 negative si pozitive, izolate din liniile HTU 5, HTU6 si HTB14, crescute in mediu normal sau incubate cu mediu stem. Se observa o crestere spectaculoasa a expresiei Lis1 in celulele CD133 izolate din HTU5 (violet) si HTU6 (albastru), la fel ca si cele isolate din celulele HTB14 (verde).

Activitate 2.2. Inocularea liniilor si a culturilor primare de glioblastom cu potential invaziv redus la nivelul sectiunilor tisulare

In cadrul acestei activitati s-a perfectionat tehnica de inoculare a sectiunilor tisulare cerebrale obtinute din creierul soarecilor. S-au realizat 7 serii succesive de experimente de obtinere a sectiunilor cerebrale si de inoculare a suspensiilor de celule de glioblastom marcate fluorescent la nivelul acestor sectiuni. In cadrul fiecarei serii s-au utilizat cate 3 soareci. Pe parcursul desfasurarii experimentelor s-au identificat mai multe aspect tehnice, care aplicate sau modificate au permis obtinerea unor rezultate experimentale imbunatatite.

Astfel, s-a constata ca pentru a obtine sectiuni tisulare viabile pe o perioada cat mai lunga este necesara utilizarea soarecilor cu o varsta cat mai mica, preferabil sub 6 zile de la nastere. Acest lucru este explicat in literatura de specialitate prin faptul ca in aceste cazuri metabolismul creierului soarecilor nou-nascuti are capacitatea de a functiona in conditii anaerobe, situatie intalnita in cazul cultivariii secitunilor cerebrale in conditii de laborator. A fost pastrat protocolul de sacrificare a soarecilor, in conformitate cu legislatia nationala si internatinala referitoare la protectia animalelor, prin inducerea comei barbiturice inainte de sacrificare animalelor. Inducerea comei s-a realizat prin injectarea fenobarbitalulu intraperitoneal, procedura minim dureroasa pentru animal. Metionam faptul ca experimentele s-au desfasurat cu acordul comisiei de etica a Spitalului Clinic "Bagdasar-Arseni". Imersia soarecelui in

apa cu gheata imediat dupa inducerea comei barbiturice, precum si recoltarea cat mai rapida a creierului si realizarea sectiunilor sunt foarte importante pentru a obtine sectiuni tisulare viabile necesare obtinerii experimentelor de migrare. Creierul recoltat este imersat imediat in solutie tampon fosfat (PBS) rece (Fig.39a), dupa care este asezata pe stativul microtomului de obtinere a sectiunilor (Fig.39b).

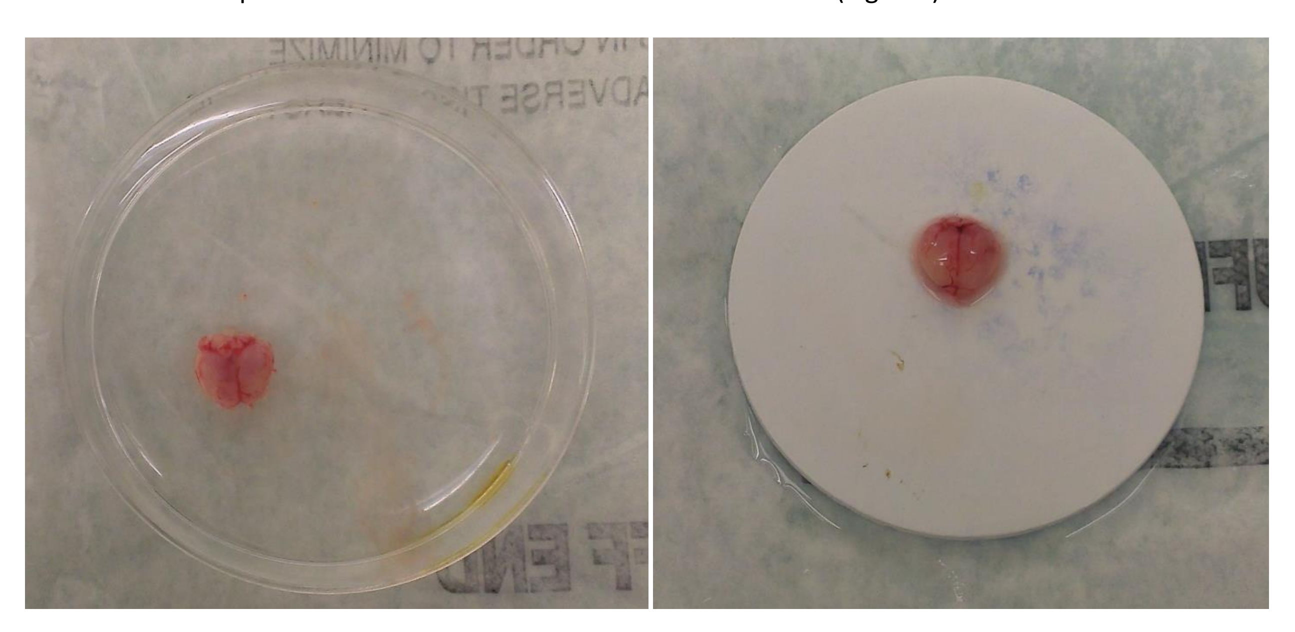


Fig.39. a. Aspectul encefalul soarecelui imediat dupa recoltare imersat in solutie tampon fosfat rece. b. aspectul encefalului recoltat asezat pe stativul microtomului.

Sectiunile obtinute cu ajutorul microtomului sunt cultivate pe membrane poroase inserate in cele sase godeurile ale placii de cultura (Fig.40). Pentru cultivare se utilizeaza mediul DMEM imbogatit cu 20% ser fetal, glutamina 1% si adaus de penicilina-streptomicina 1%. Un aspect important de mentionat este cantitatea mediului introdus in fiecare godeu. Este important ca mediul de cultura sa nu acopere complet sectiunea cerebrala. Aceasta trebuie sa fie asezata in asa fel incat sa fie situata la intefata mediu-aer. In aceasta conditie experimentala, este suficient mediu incat sa intre in contact cu membrana poroasa d eunde prin difuzie va hrani continuu sectiunea tisulara, dar in acelas timp nu este in cantitate prea mare, incat sa acopere complet sectiunea tisulara si sa determine desprinderea ei de pe membrana poroasa. In urma experimentelor realizate am stabilit o cantitate de minim 800 si maxim 1000 microlitri de mediu de cultivare care trebuie introdusa in fiecare godeu al placii de cultura. Este de asemenea importanta schimbarea zilnica a mediului de cultura, pentru mentinerea viabilitatii ssectiunilor tisulare. Imediat dupa pozitionarea sectiunilor in godeuri si adaugarea mediului de cultura, placa este introdusa in incubator si mentinuta la o temperatura de 37 grade, in atmosfera umeda imbogatita cu 5% CO_2.



Fig.40. Sectiunile cerebrale cultivate pe membranele poroase introduse in godeurile placii de cultura, la care s-a adaugat mediul de cultura.

Dupa 48-72 ore de la cultivare se poate injecta suspensia de celule de glioblastom pentru realizarea experimentelor de migrare. O problema tehnica ce apare de regula in timpul procedurilor de inoculare, mentionata de catre autori si semnalata si in literatura de specialitate, o constituie dificultatea injectarii suspensiei celulare strict in interiorul sectiunii in conditiile in care sectiunile cerebrale au o grosime medie de 400-500 microni si se utilizeaza un ac cu bizou. Astfel in multe dintre experimentele de inoculare se constata cum o mare parte dintre celulele tumorale nu se mai regasesc la locul de injectare ci sunt localizate in afara sectiunii, la periferia ei, datorita scurgerii suspensiei celulare in momentul injectarii pe suprafata sectiunii catre periferia ei (Fig.41).

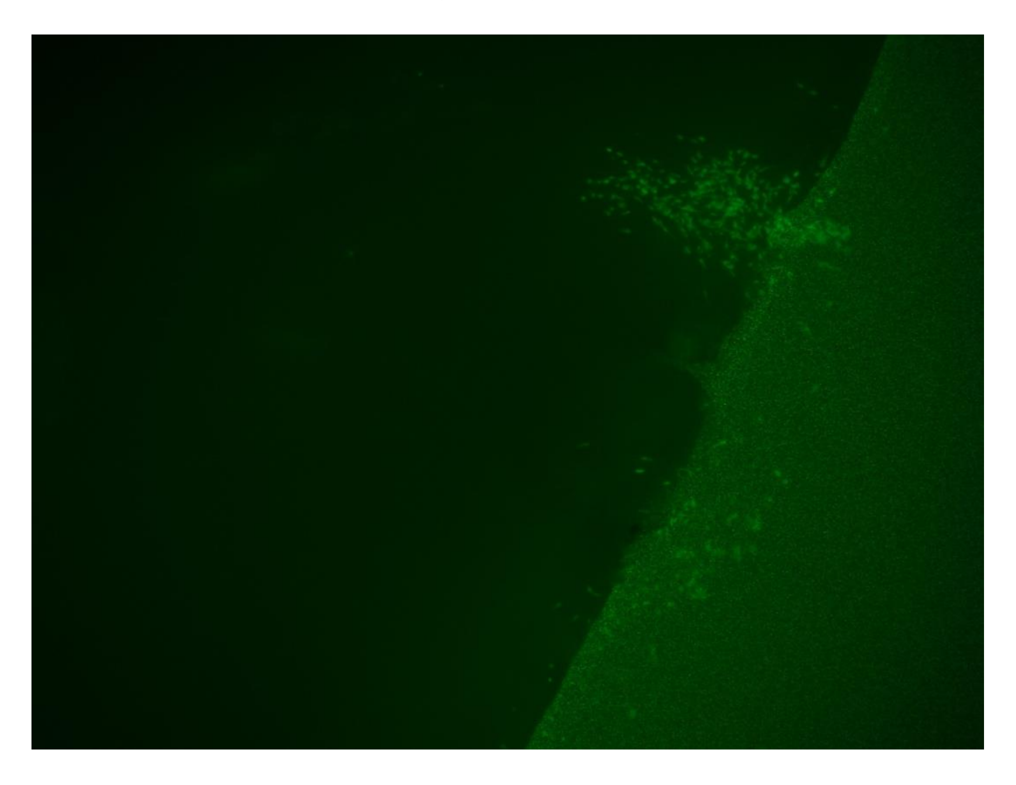


Fig.41. Marginea unei sectiuni cerebrale imediat dupa injectatarea cu celule de glioblastom HTB14 marcate fluorescent. Se poate observa cum majoritatea celulelor se localizeaza la nivelul marginii sectunii in loc sa ramana cantonate in centrul sectiunii.

Pentru a surmonta aceasta problema autorii au imaginat pe langa varianta de injectare a unui ac cu bizoul secitonat si o varianta ce presupune aspirarea usoara a portiunii centrale a sectiunii cu o micropipeta de 10

microlitri, urmata de pipetarea unui volum de 5 microlitri de suspensie celulara ce contine aprox 10.000 celule de glioblastom HTB14 marcate fluorescent. Aceasta tehnica determina formarea unei mici depresiuni in centrul sectiunii (Fig.42), depresiune ce nu permite celulelor de glioblastom din suspensie sa se scurga la marginea sectiunii. Ele vor ramane cantonate in mijlocul sectiunii cateva ore pana cand vor incepe sa adere de sectiune in prima etapa si ulterior sa invadeze sectiunea tisulara.

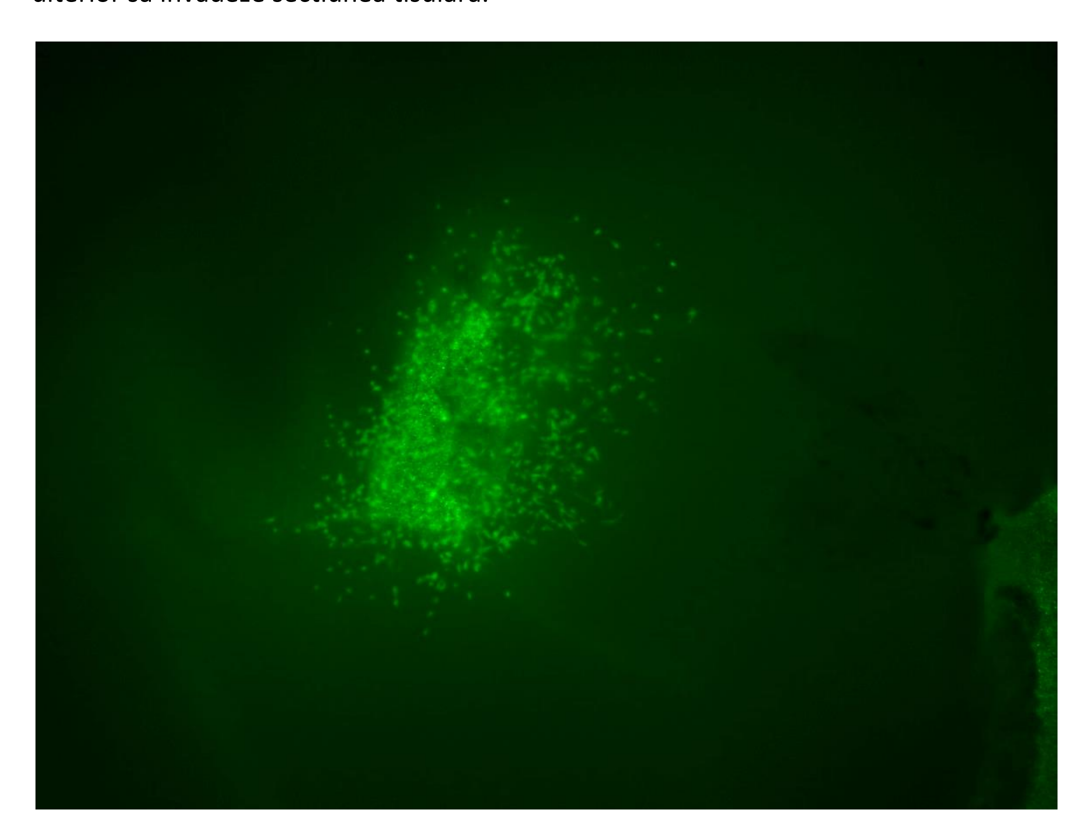


Fig.42. Aspectul sectiunii cerebrale imediat dupa inocularea celulelor HTB14 marcate fluorescent. Localizarea celulelor este la nivelul portiunii centrale a sectiunii unde s-a realizat anterior inoculari o mica "depresiune"prin asirarea usoara cu o micropipeta. Aceasta are un aspect mai luminos comparativ cu restul sectiunii si permite cantonarea celulelor la nivelul impiedicand scurgerea suspensiei celulare spre periferie, pana in momentul in care celulele de glioblastom incep sa adere de sectiune si sa invadeze sectiunea.

Prin realizarea mai multor serii experimentale de injectare a sectiunilor cerebrale cu celule de glioblastom marcate fluorescent s-a validat acest model experimental. Astfel, a fost evidenta capacitatea celulelor de glioblastom HTB14 marcate fluorescent sa invadeze progresiv sectiunile cerebrale in 11 de la inoculare (Fig. 43a,b). Intr-unul dintre seriile experimentale obtinute s-a observat o capacitate rapida de invazie a sectiunii tisulare, observandu-se o invadare a sectiunii intr-un interval de scurt, de 7 zile (Fig.44a,b).

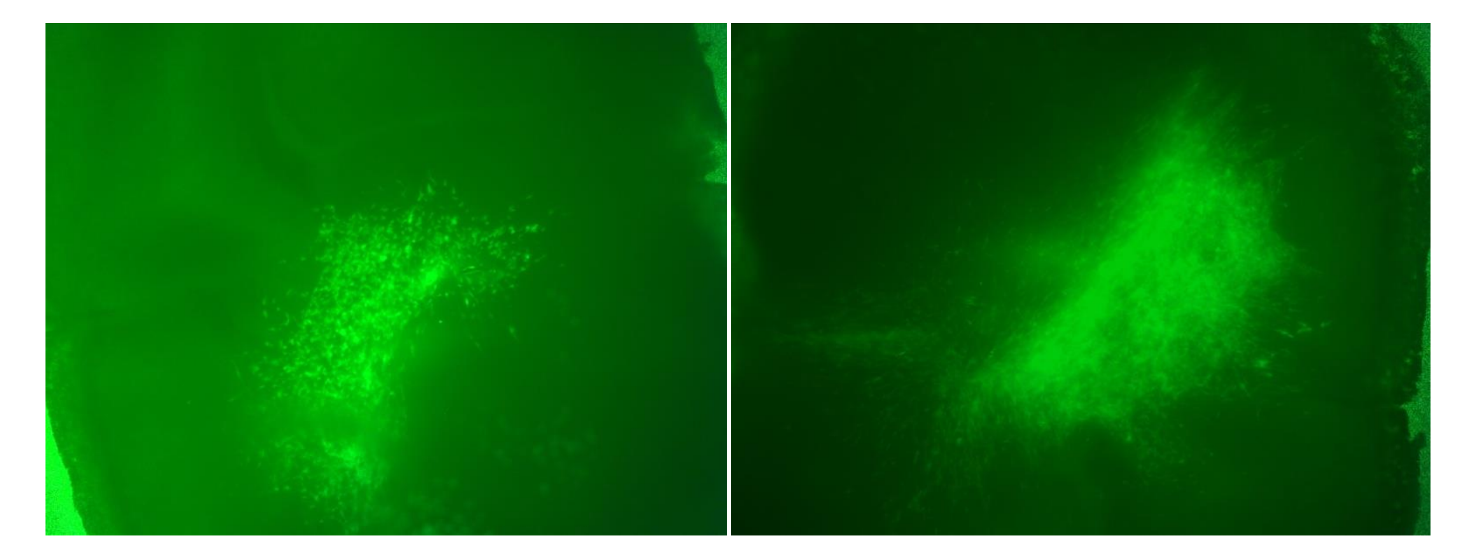


Fig.43.a Sectiune cerebrala la 24 de ore de la inocularea celulelor HTB14 marcate fluorescent si la b. 11 zile de la inoculare

In restul seriilor experimentale realizate s-a putut constata o capacitate invaziva celulelor de glioblastom mare, dar ceva mai lenta comparativ cu intervalul anterior, intr-un interval de 11 zile (Fig.34)

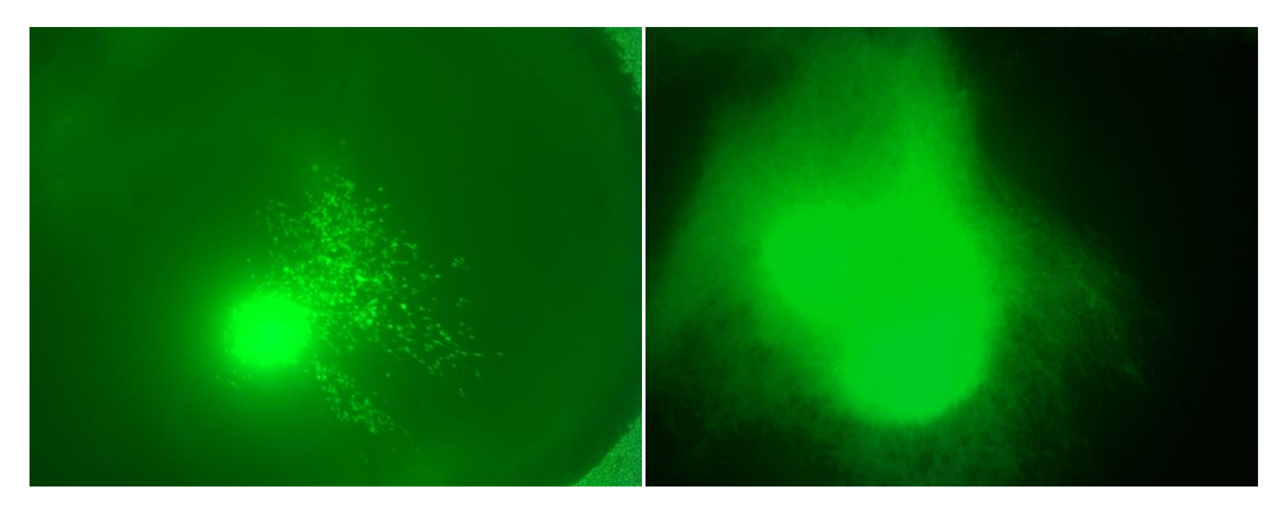


Fig.44 a .Sectiune cerebrala la 24 de ore de la inocularea celulelor HTB14 marcate fluorescent si la b. 7 zile de la inoculare

Prin utilizarea unui obiectiv de x20 se poate constata cu usurinta aspectul fenotipic particular al celulelelor de glioblastom infiltrative;respectiv forma elongata, cu una/doua prelungiri, situate la cele doua extremitati ale celulelor tumorale (Fig.45).

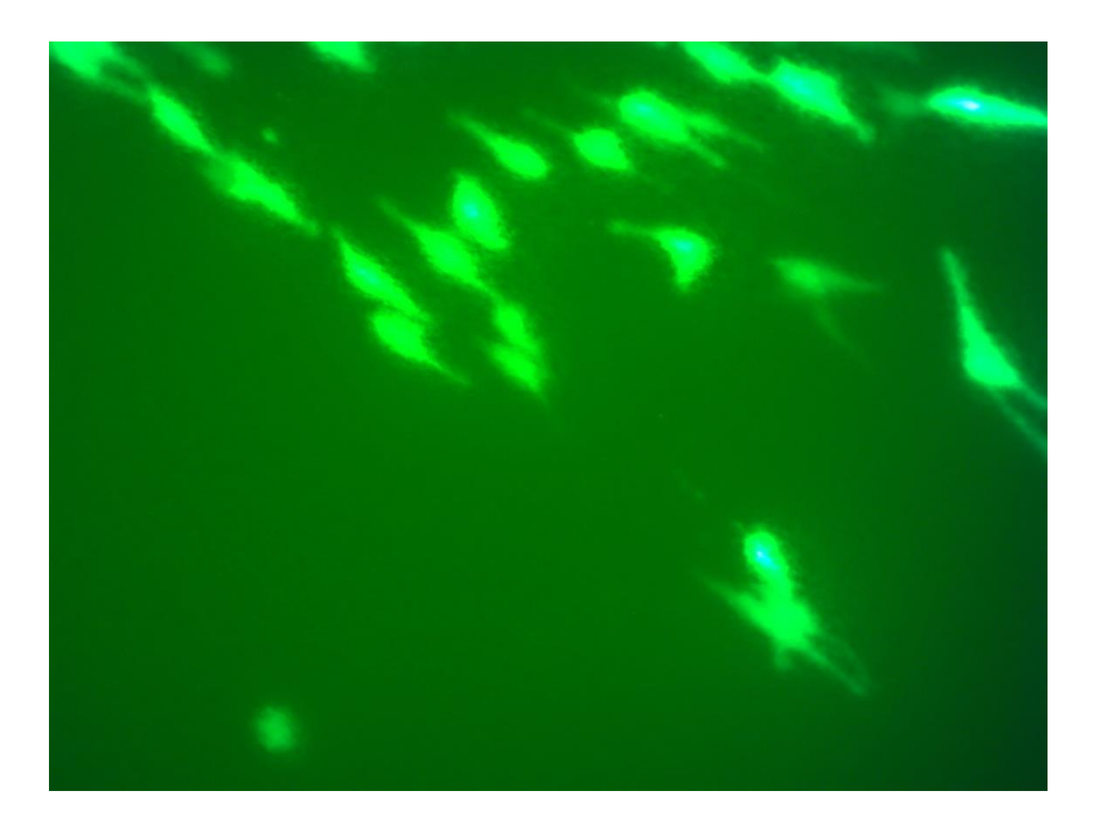


Fig. 45. Aspectul fenotipic particular al celuleleor de glioblastom infiltrative;respectiv forma elongata, cu una/doua prelungiri, situate la cele doua extremitati ale celulelor tumorale

Activitate 2.3. Evaluarea eficientei inhibarii migrarii prin utilizarea noului model experimental-monitorizarea migrarii celulelor tumorale prin microscopia in fluorescenta

Dupa ce s-au realizat mai multe serii experimentale de migrare a celulelor de glioblastom U87 (HTB14), fapt ce a permis stabilirea unui protocol experimental exact si obtinerea unor rezultate experimentale reproductibile, s-a trecut la urmatoarea acitivitate (Activitatea 2.3), respectiv cea de evaluare a eficientei inhibarii invaziei celulelor de glioblastom la care a fost blocata gena de sinteza a proteinei LIS1, una dintre moleculele considerate a avea un rol in migrarea celulelor de glioblastom. Tehnica de transfectie a liniei de glioblastom HTB14 cu plasmida ce contine GFP pentru obtinerea celulelor HTB14 GFP si apoi cu plasmida shLIS1 au fost detaliate in etapa anterioara. De mentionat ca linia HTB14 GFP shLIS1 a fost testata pentru a demonstra scaderea semnificativa (>90%) a expresiei LIS1.Pentru realizarea experimentelor de migrare in cadrul acestei activitati au fost folosite liniile transfectate HTB14 GFP (control) si respectiv HTB14GFP shLIS1 (linia de testare). Au fost realizate 3 serii experimentale (triplicat). In cadrul fiecarui experiment, din cele 6 sectiuni cerebrale incluse in godeurile placii de cultura, 3 sectiuni au fost inoculate cu celulele HTB14 GFP si constituie controlul si 3 sectiuni au fost inoculate cu linia GFP14GFP transfectata cu shLIS1. S-au obtinut imagini la 1, 3, 5 si 7 zile de la inoculare. S-a comparat distanta maxima de migrarea celulelor HTB14 GFP transfectate cu shLIS1 comparativ cu cele native. S-a constata o diferenta semnificativ statistica intre distanta de migrare de la locul de inoculare la celulele infiltrative din periferie intre celulele de gliblastom HTB14 native comparativ cu cele la care expresia LIS1 a fost diminuata (Fig.46). Diferenta medie este de 500 micrometri intre control si linia testata ($p<0,05$).

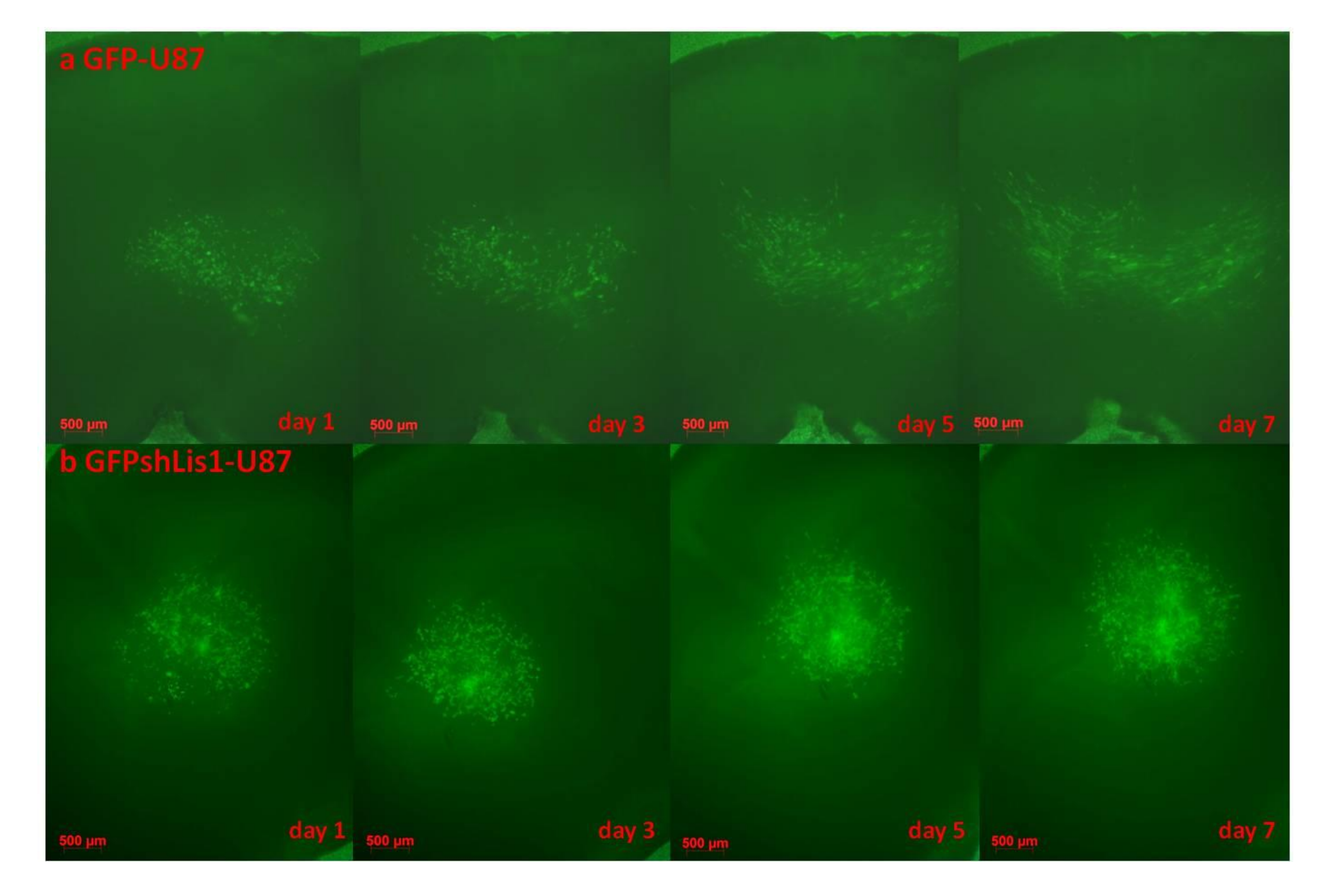


Fig. 46. Imaginile sectiunilor cerebrale inoculate cu HTB14 GFP (GFP-U87) sus (a), respectiv GFPshLIS1-U87 jos (b), achizitionate la 1, 3, 5 si 7 zile de la inoculare. Se poate observa cum celulele GFP-U87 (controlul) invadeaza progresiv cele doua emisfere cerebrale ale sectiunii, in timp ce celulele de glioblastom la care gena LIS1 a fost blocata raman cantonate la nivelul zonei de inoculare.

Aceste rezultate subliniaza rolul important pe care-l are molecula LIS1 in invazia celulelor de glioblastom. Interesant este faptul ca la experimentele de migrare pe suprafata placii de cultura din cadrul etapei anterioare (testul "scrape migration assay") nu s-au constatat diferente semnificative intre control si linia testata. Coroborand cele doua rezultate se confirma supozitia unor autori (netestata pana acum) conform careia molecula LIS1 are rol, prin interactiune cu dineina si miozina II, in migrarea celulei de glioblastom in tesut, in mediul tridimensional, reprezent o componenta importanta a motorului molecular implicat in translocarea nucleului in timpul deplasarii celulei printre jonctiunile intercelulare ale tesutului nervos cerebral, in decursul procesului de invazie a tesutului cerebral sanatos peritumoral. Acest motor molecular nu este necesar in timpul migrarii celulelor de glioblastom pe suprafata placii de cultura (Beadle si colab 2008 (5)) .

Etapa IV

In cadrul etapei IV a proiectului cu titlul „A new anti-invasive experimental strategy for infiltrative malignant gliomas”, cod proiect PN-II-RU-TE-2012-3-0235, au fost indeplinite urmatoarele obiective propuse in planul de realizare al proiectului:

Obiectiv 1. Blocarea genelor/moleculelor tinta implicate in invazia glioamelor – evaluarea expresiei tisulare a moleculelor tinta:

- Activitate 1.1. Blocarea genelor/moleculelor tinta in liniile de glioblastom si in culturile primare de glioblastom

- Activitate 1.2. Inocularea liniilor si a culturilor primare de glioblastom cu potential invaziv redus la nivelul sectiunilor tisulare

- Activitate 1.3. Studii de imunofluorescenta/imunohistochimie pe noul model experimental

Obiectiv 2. Trasarea concluziilor si redactarea raportului final

- Activitate 2.1. Trasarea concluziilor si diseminare rezultate

- Activitate 2.2. Redactarea raportului final

Activitate 1.1. Blocarea genelor/moleculelor tinta in liniile de glioblastom si in culturile primare de glioblastom

In cadrul acestei activitati am realizat blocarea activitatii genei SNAI2, una dintre genele demonstrate ca fiind supraexprexprimate in etapa I a proiectului in probele de glioblastom comparativ cu probele normale. In cadrul etapei I, am demonstrat faptul ca SNAI2 este din punct de vedere statistic supraexprimat in probele de glioblastom comparativ cu cele normale. Astfel nivelul expresiei moleculei SNAI2 este de doua ori mai mare decat expresia in tesutul normal. Acest fapt ce sugereaza faptul ca molecula SNAI2 are un rol important in proliferarea si migrarea celulelor tumorale de glioblastom. Pornind de la aceasta constatare am ales gena SNAI2 ca o gena tinta pentru a studia rolul acesteia in proliferarea si invazia glioblastomului.

1. Obtinerea celulelor din linia HTB-14 care nu exprima gena Snai1 (shSnai1-HTB-14).

In vederea obtinerii liniei celulare shSnai1-HTB-14 celulele HTB-14 au fost cultivate in mediu DMEM cu 4.5‰ glucoza, suplimentat cu ser fetal bovin (10%) si antibiotic (penicilina, streptomicina si neomicina). In vederea transfectarii cu plasmidele continand shSnai1, celulele au fost pasate prin tripsinizare in placi de plastic de 5 cm diametru la o densitate de 10^5celule/cm^2. Inainte de transfectie, mediul de cultura a fost shimbat mediul pentru transfectie, in care nivelul de proteine este minim - insulina și transferina fiind singurele suplimente proteice (SantaCruz -Plasmid Transfection Medium sc-108062).

Plasmidele folosite pentru inhibarea expresiei genei Snai1 contin 3 tipuri de shRNA specific pentru pentru SnalL, clonate intr-un vector lentiviral. Fiecare secventa de shRNA contine 19-25 nucleotide avand o structura in „ac de par” – ceea ce conduce la blocarea expresiei genei respective. Plasmidele cu shSnai1

contin o genă de rezistență la puromicină pentru selectarea celulelor care exprimă stabil shRNA. Transfectia a fost realizata cu reactivul Plasmid Transfection Reagent sc-108061, de la Santa Cruz, urmarind protocolul furnizorului. Astfel, 2 µg plasmida shLis au fost dizolvate in 200 µl (volum final) mediu sc-108062, iar 6 µl din reactivul de transfectie au fost diluati in 200 µl (volum final) mediu sc-108062. Amestecul obtinut intre solutia de plasmide si reactivul de transfectie a fost adaugat peste celulele HTB-14 spalate si cultivate in mediu sc-108062. Dupa 48 de ore de la transfectie a fost schimbat mediul si a fost adaugata puromicina in concentratie finala de 1µg/ml. Dupa 2 saptamani au fost izolate clone de celule rezistente la geneticina si puromicina.In linia celulara glioblastoma HTB-14 transfectata cu shSnai1 confirmarea inhibarii expresiei genei Snai1 a fost realizata prin Real Time folosind sonde TaqMan cat si prin Western Blot. Pentru experimentele control, celulele HTB-14 au fost transfectate cu o plasmida care continea un shRNA nespecific clonat in acelasi vector (Santa Cruz, plasmid A, sc-108060).

Pentru experimentele de Western Blot, celulele au fost spalate cu tampon fosfat si solubilizate in solutie Laemmli pentru electroforeza. Pe fiecare godeu au fost incarcate 50ug proteina. Dupa migrarea electroforetica, proteinele au fost transferate pe membrane de nitroceluloza, care a fost incubata in solutie de lapte degresat 5% si apoi in solutie de BSA continand anticorpul specific anti Snai1 (Santa Cruz) in dilutie 1/500. Din imaginea de mai jos (Fig.47) reiese ca expresia Snai1 a fost represata de shRNA exprimat in celulele transfectate (godeul 3), in comparative cu celulele control (godeul 1 si 2).

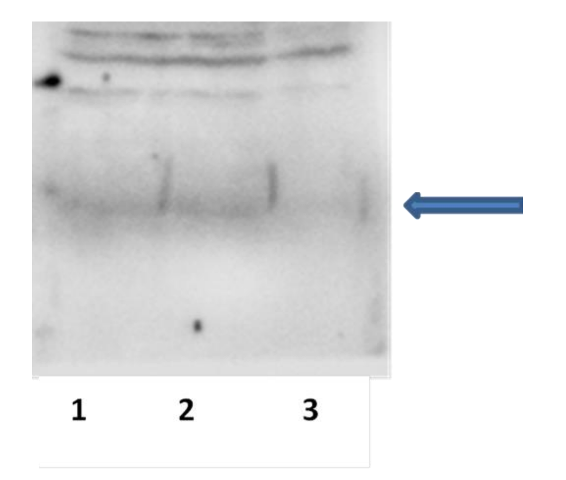


Figura 47. Confirmarea silentierii genei Snai1 in celulele HTB-14 transfectate cu shRNA, prin Western Blot . Godeurile 1 si 2 – cellule control transfectate cu plasmida care continea shRNA nespecific si godeul 3 celule transfectate cu shRNA specific pentru Snai1. Se poate observa diminuarea semnalului obtinut pentru proteina Snai1 de 29kDa in godeul 3.

Liniile transfectate cu shRNA au fost ulterior transfectate cu o plasmida care codifica pentru gena proteinei fluorescente verzi sau rosii (GFP sau RFP), pentru a putea fi urmarite prin microscopie de fluorescenta

2. Evaluarea capacitatii de proliferare a celulelor HTB14 care au silentiata gena Snai1

In vederea evaluarii proliferarii celulelor transfectate cu shSnai1 HTB14, celulele au fost insamantate in placi cu 6 godeuri (25000 celule/ godeu) si densitatea celulara a fost evaluata pein numararea celulelor vii (in prezenta de Tripan Blue) in zilele 2,3,4 si 8 urmatoare insamantarii. Rezultatele prezentate in Figura 48 arata ca celulele transfectate au o rata mai rapida de amplificare in primele 3 zile, dupa care amplificarea este asemamatoare cu a celulelor control, ajungand dupa 8 zile de cultivare la o densitate celulara de ~$1{,}3 \times 10^6$ celule/godeu de $9 cm^2$. Experimentele au fost repetate de trei ori, iar in figura de mai jos sunt redate rezultatele unui experiment reprezentativ (Fig.48).

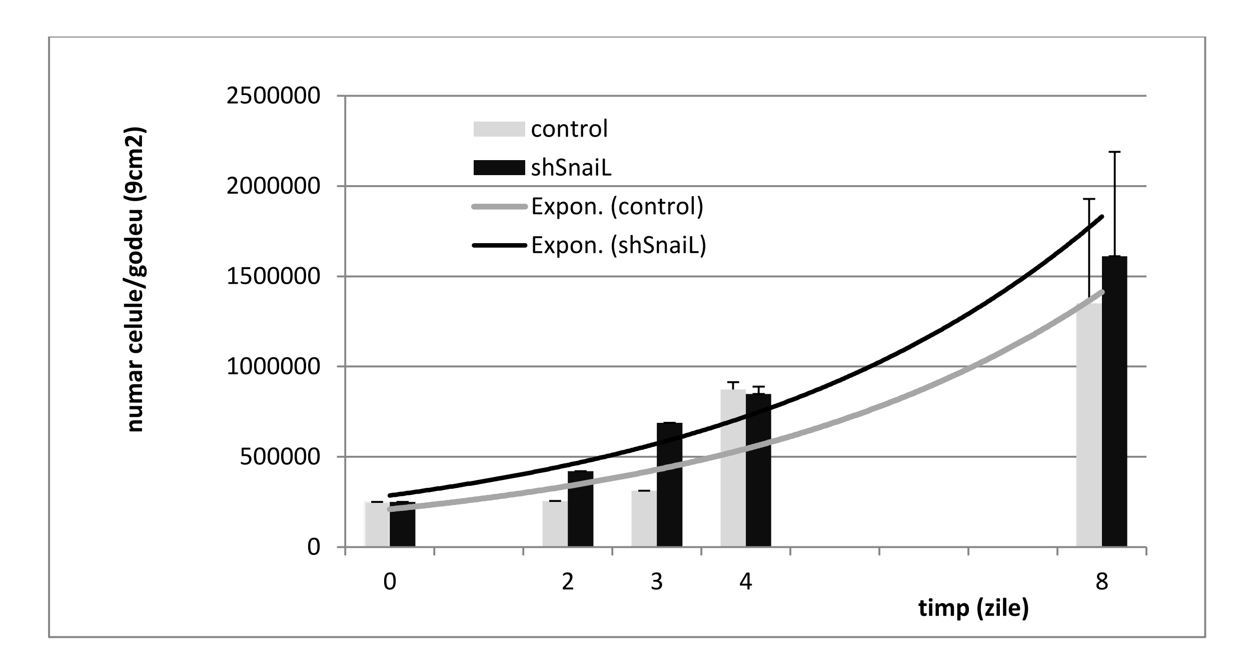


Figura 48. Rata proliferarii celulelor transfectate cu shSnai1. Celulele transfectate au o rata mai rapida de amplificare in primele 3 zile, dupa care amplificarea este asemamatoare cu a celulelor control, ajungand dupa 8 zile de cultivare la o densitate celulara de ~$1,3x10^6$ celule/godeu de $9cm^2$.

Evaluarea gradului de atasare de substrat a celulelor transfectate a fost realizata cu ajutorul sistemului de monitorizare xCELLigence. Acest sistem permite monitorizarea in timp real a viabilitatii celulare. Sistemul xCELLigence utilizează plăci de microtitrare special concepute care conțin microelectrozi de aur interdigitati care permit monitorizarea noninvaziva a viabilitatii celulelare, prin citirea impedantei electrice. Prezența celulelor pe electrozi afecteaza mediul ionic local la interfața electrod / solutie, ceea ce duce la o creștere a impedantei. Cu cat mai multe celule sunt atașate pe electrozi, cu atât impedanta va creste mai mult.

Celulele din linia HTB14 si celulele transfectate shSnai1HTB14 au fost cultivate in godeurile placilor speciale pentru xCelligence (cate 10000celule/godeu). Incubarea a fost facuta cu DMEM cu 10% ser fetal.

Rezultatele arata o capacitate de atasare diminuata a celulelor in care a fost silentiata gena Snai1 (linia verde) comparative cu celulele control, transfectate cu o plasmida cu shRNA nespecific (linia rosie), asa cum e redat in Figura 49.

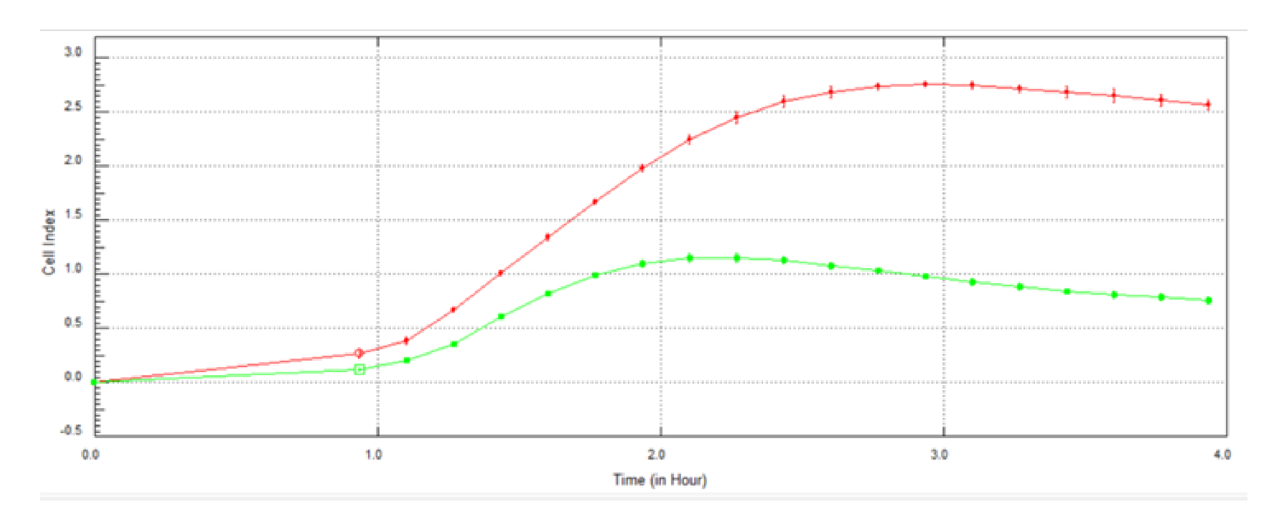


Fig 49. Aderarea celulelor HTB14 si shSnai1-HTB14 inregistrata cu sistemul xCELLigence. Se observa ca celulele din linia HTB14 control (transfectate cu plasmida A) au o capacitate de aderare superioara (linia rosie) fata de celulele transfectate shSnai1HTB14 (linia verde).

Activitate 1.2. Inocularea liniilor si a culturilor primare de glioblastom cu potential invaziv redus la nivelul sectiunilor tisulare

In cadrul Activitatii 1.2 a etapei IV s-au realizat experimente de inoculare a liniei de glioblastom U87 transfectate cu shSNAI2. Au fost realizate patru serii de experimente. In fiecare serie de experimente au fost utilizati cate 4 soareci de laborator. S-au obtinut sectiuni tisulare cerebrale care au fost cultivate. Metionam faptul ca experimentele s-au desfasurat cu acordul comisiei de etica a Spitalului Clinic "Bagdasar-Arseni". Imersia soarecelui in apa cu gheata imediat dupa inducerea comei barbiturice, precum si recoltarea cat mai rapida a creierului si realizarea sectiunilor sunt foarte importante pentru a obtine sectiuni tisulare viabile necesare obtinerii experimentelor de migrare. Creierul recoltat este imersat imediat in solutie tampon fosfat (PBS) rece (Fig.50a), dupa care este asezata pe stativul microtomului de obtinere a sectiunilor (Fig.50b).

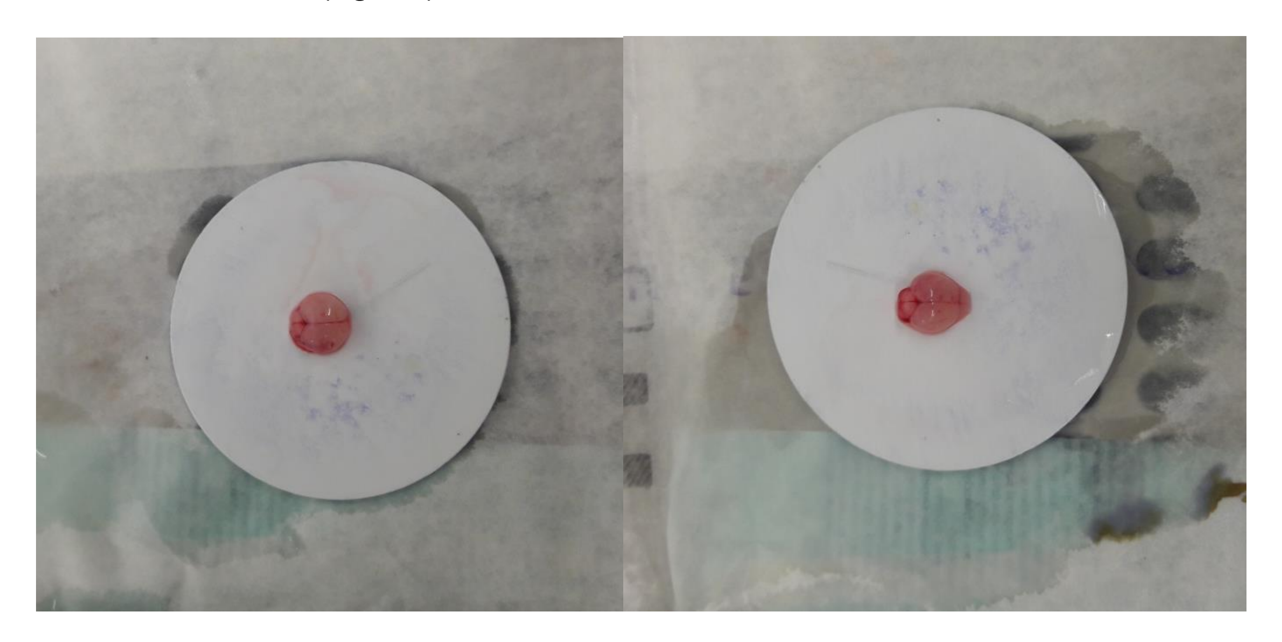


Fig.50. a, b. Aspectul encefalul soarecelui imediat dupa recoltare asezat pe stativul microtomului.

Sectiunile obtinute cu ajutorul microtomului sunt cultivate pe membrane poroase inserate in cele sase godeurile ale placii de cultura (Fig.51). Pentru cultivare se utilizeaza mediul DMEM imbogatit cu 20% ser fetal, glutamina 1% si adaus de penicilina-streptomicina 1%. Imediat dupa pozitionarea sectiunilor in godeuri si adaugarea mediului de cultura, placa este introdusa in incubator si mentinuta la o temperatura de 37 grade, in atmosfera umeda imbogatita cu 5% CO_2.

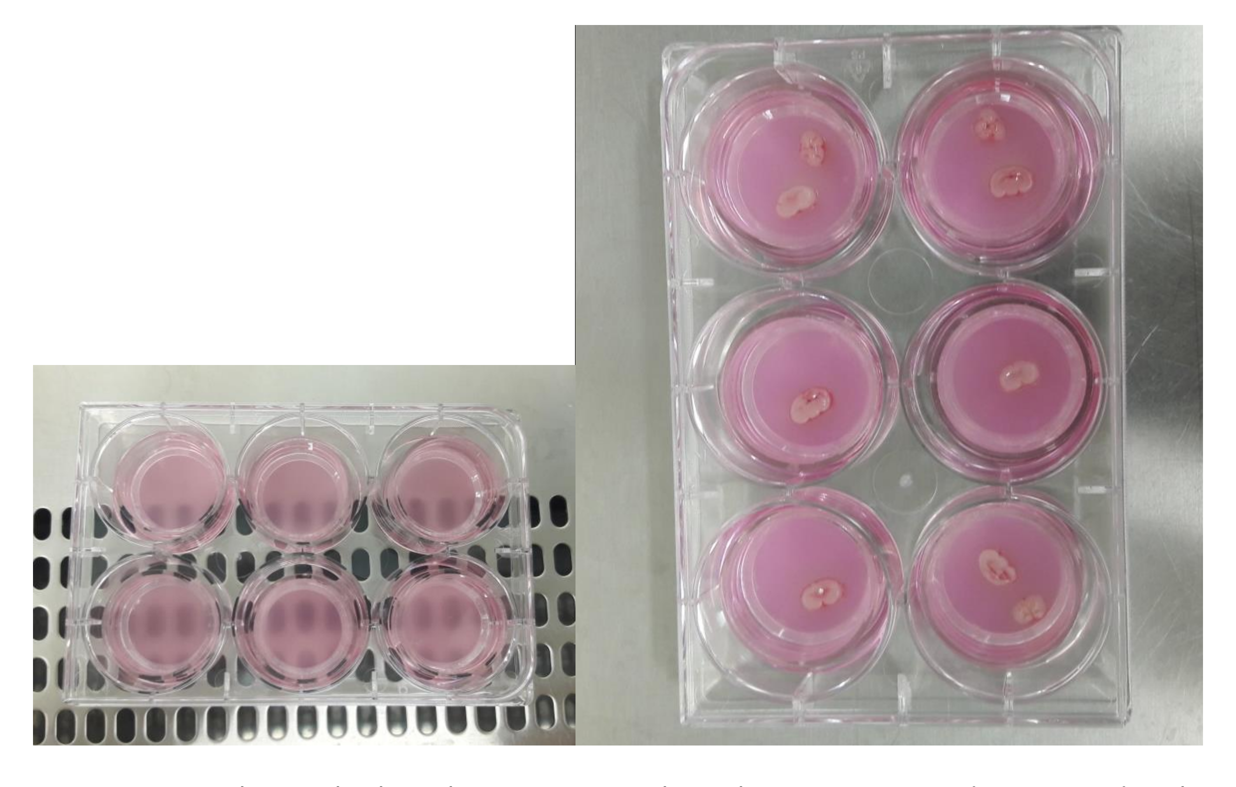


Fig.51. Sectiunile cerebrale cultivate pe membranele poroase introduse in godeurile placii de cultura, la care s-a adaugat mediul de cultura.

Dupa 48 ore de la cultivare se poate injecta suspensia de celule de glioblastom pentru realizarea experimentelor de migrare. Injectarea suspensiilor celulalre s-a efectuat, la fel ca la experimentele anterioare, cu ajutorul sistemului automat de injectare UMP 3-1 injection system , ghidat fiind de sistemul stereotactic experimental TAXIC-600 - WPI Stereotaxic Frame (World Precision Instruments, Germany) (Fig.52). S-au injectat, folosindu-se microseringa Hamilton, 5 microlitri de suspensie, la o concentratie de 10.000 celule tumorale/microlitru, in centrul sectiunii tisulare. Injectarea suspensiei pentru fiecare sectiune s-a facut automat, controlat electronic, pe parcursul unui interval de 5 minute. S-a asteptat apoi 1 minut dupa terminarea injectarii pana la retragerea acului pentru a preveni refluarea suspensiei celulare.



Fig52.a. Sistemul de injectare automat al suspensiei celulare conectat la sistemul stereotactic ce ghideaza seringa Hamilton spre centrul sectiunii tisulare. b. Seringa Hamilton incarcata cu suspensia celulara fixata la sistemul automat de injectare.

Activitate 1.3. Studii de imunofluorescenta/imunohistochimie pe noul model experimental.

In cadrul Activitatii 1.3 a etapei IV s-au monitorizat prin microscopia in fluorescenta potentialul migrator si tumorigen al celulelor de glioblastom HTB-14 (U87) marcate fluorescent si inoculate la nivelul sectiunilor cerebrale de soarece. Celulele de glioblastom HTB-14 (U87) transfectate cu shRNA pentru SNAI2 si pentru gena proteinei fluorescente verzi (GFP) au manifestat in sectiunile tisulare cerebrale o scadere semnificativa atat a viabilitatii cat si a capacitatii de migrare (Fig. 53) comparativ cu controlul (celulele de glioblastom U87 transfectate doar cu gena GFP) (Fig.54).

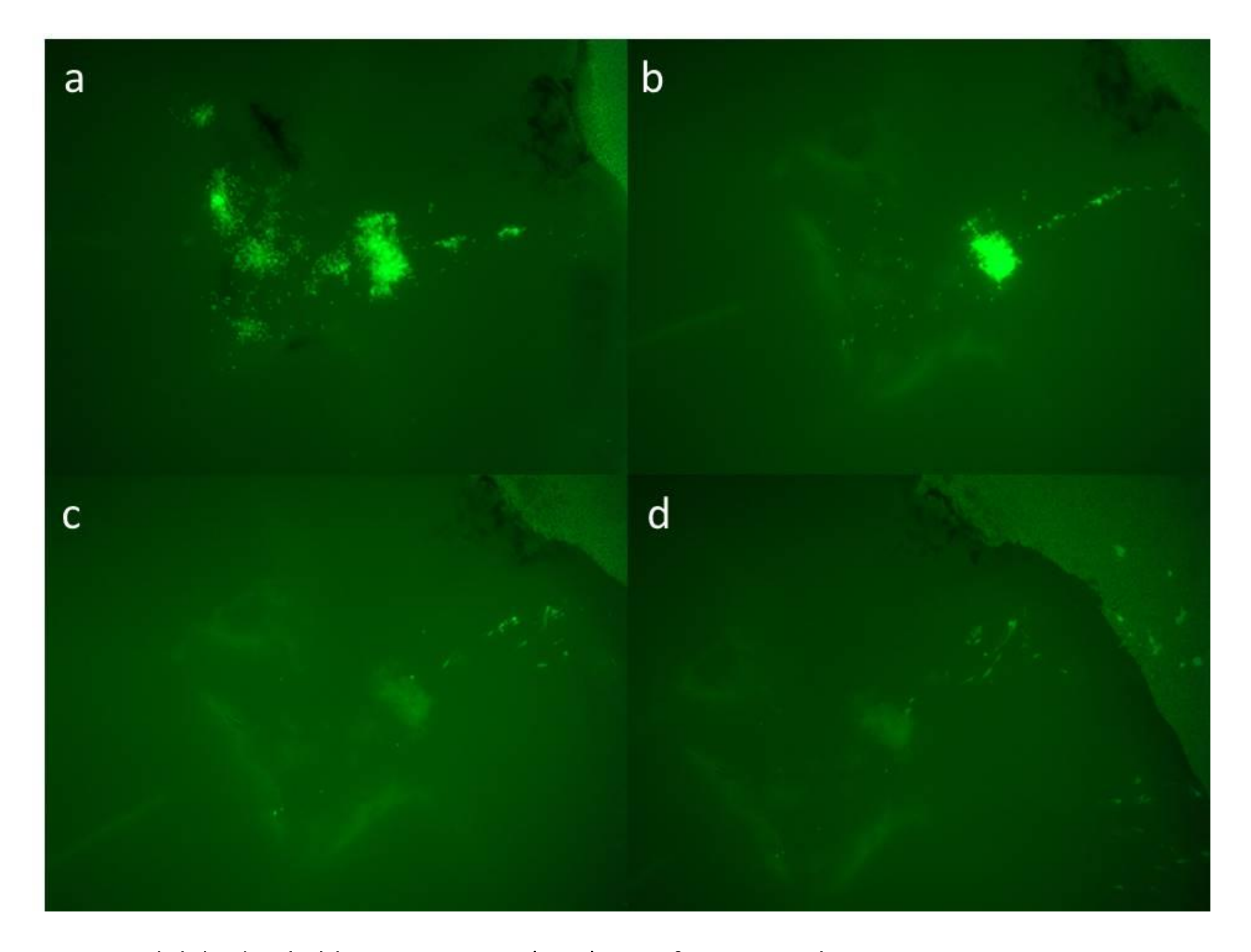


Fig.53. Celulele de glioblastom HTB-14 (U87) transfectate cu shRNA pentru SNAI2 si pentru gena proteinei fluorescente verzi (GFP) au o capacitate migratorie redusa comparativ cu celulele de control. Imagini achizitionate la 24 ore (a), 3 zile (b), 5 zile (c) si 7 zile (d) de la injectare.

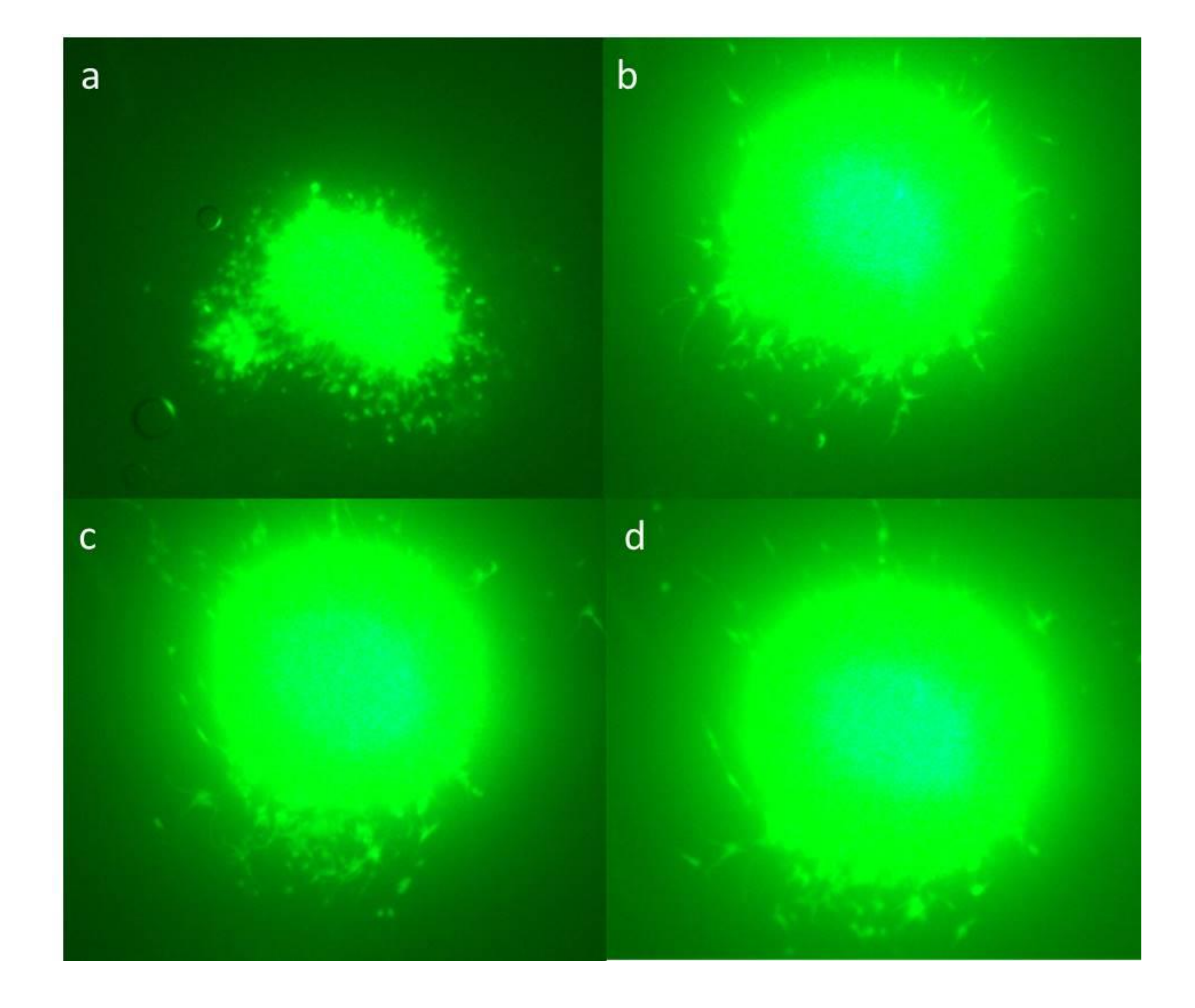


Fig.54. Celulele de glioblastom HTB-14 (U87) transfectate doar cu gena proteinei fluorescente verzi (GFP) (control) isi mentin capacitate migratorie si de proliferare. Imagini achizitionate la 24 ore (a), 3 zile (b), 5 zile (c) si 7 zile (d) de la injectare

Celulele de glioblastom HTB-14 (U87) transfectate cu shRNA pentru SNAI2 si pentru gena proteinei fluorescente rosi (RFP) au confirmat rezultatele intrucat au prezentat de asemenea in sectiunile tisulare cerebrale o scadere semnificativa atat a viabilitatii cat si a capacitatii de migrare (Fig. 55) comparativ cu controlul (celulele de glioblastom U87 transfectate doar cu gena RFP) (Fig.56).

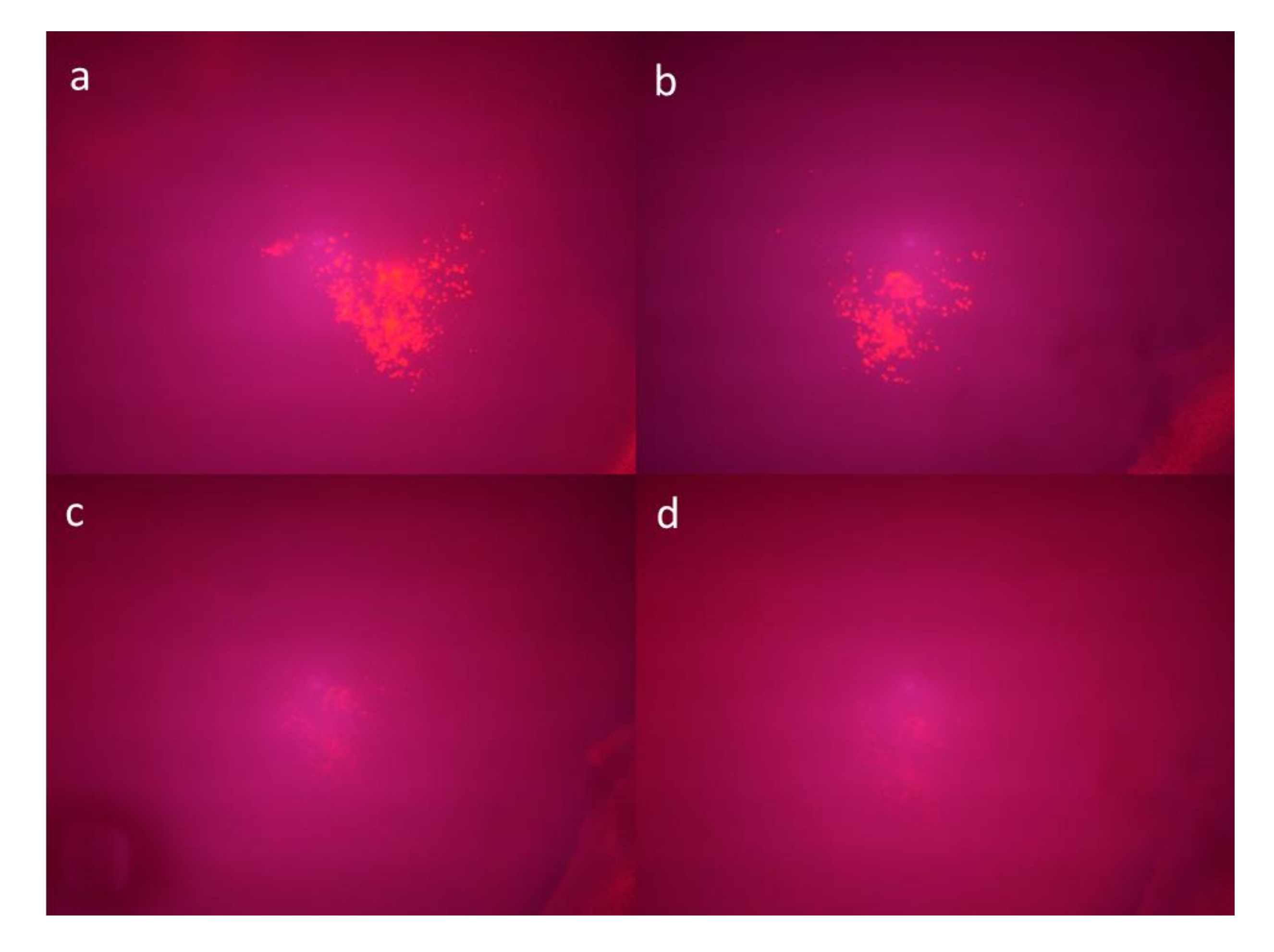


Fig.55. Celulele de glioblastom HTB-14 (U87) transfectate cu shRNA pentru SNAI2 si pentru gena proteinei fluorescente rosi (RFP) au o capacitate migratorie redusa comparativ cu celulele de control. Imagini achizitionate la 24 ore (a), 3 zile (b), 5 zile (c) si 7 zile (d) de la injectare.

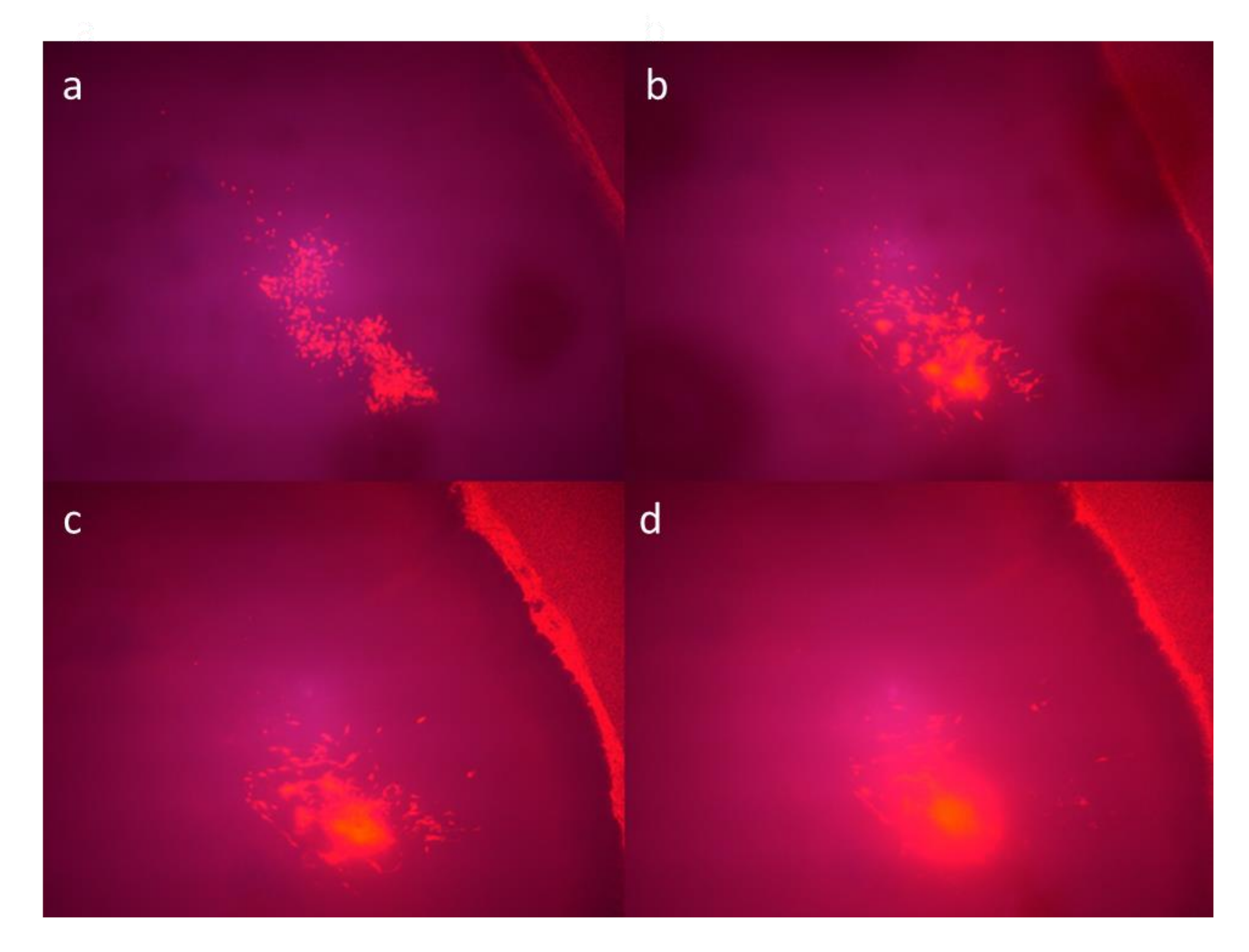


Fig. 56. Celulele de glioblastom HTB-14 (U87) transfectate doar cu gena proteinei fluorescente rosi (RFP) (control) isi mentin capacitate migratorie si de proliferare. Imagini achizitionate la 24 ore (a), 3 zile (b), 5 zile (c) si 7 zile (d) de la injectare

Activitate 2.1. Trasarea concluziilor si diseminare rezultate

Concluzii finale

1. Rezultatele obtinute in etapa I si II a proiectului au demonstrat fara echivoc faptul ca doua dintre genele analizate, respectiv gena SNAI2 si gena TWIST1 sunt supraexprimate in glioamele cerebrale. Mai mult, pentru gena SNAI2 s-a putut observa o relatie directa intre gradul de malignitate tumorala si gradul expresiei, expresia genei fiind maxima pentru gradul IV,, cel mai inalt grad de malignitate al glioamelor cerebrale.

2. Modelul experimental dezvoltat de autori din probele tisulare recoltate in timpul procedurilor de biopsie stereotactica in etapa I a proiectului este util pentru evaluarea imunohistochimica a celulelor tumorale ce infiltreaza periferia tumorala

3. In urma experimentelor efectuate in cadrul etapei II a proiectului, prin modificarea si adaptarea protocoalelor existente in literatura, am reusit sa obtinem un model experimental eficient de tip “organotypic brain slices” , ce permite monitorizarea si inregistrarea proliferarii si migrarii celulelor de glioblastom.

4. In cadrul etapei III a proiectului, s-a realizat separarea celulelor CD133 pozitive si s-a determinat expresia Lis1 in aceste celule izolate din doua culture primare de glioblastom (HTU5 si HTU6) si celulele din linia HTB14. Rezultatele arata o crestere spectaculoasa a expresiei Lis1 in celulele CD133 izolate din HTU5 si HTU6, la fel ca si cele izolate din celulele HTB14. Aceste rezultate au fost raportate pentru prima data in literatura de specialitate.

5. Prin utilizarea tehnicii xCELLigence s-a monitorizat migrarea si proliferarea celulara. S-a observat o diminuare a migrarii celulare si a proliferarii celulare in cazul celulelor CD133 pozitive HTB-14 shLis1 comparativ cu celulele CD133 pozitive HTB14 control, rezultate raportate pentru prima data in literatura de specialitate.

6. La testele de migrare "in tissue" utilizandu-se modelul "organotypic brain slices" s-a constata o diferenta semnificativ statistica intre distanta de migrare de la locul de inoculare la celulele infiltrative din periferie intre celulele de gliblastom HTB14 native comparativ cu cele la care expresia LIS1 a fost diminuata. Se poate observa cum celulele GFP-HTB14 (controlul) invadeaza progresiv cele doua emisfere cerebrale ale sectiunii, in timp ce celulele de glioblastom la care gena LIS1 a fost blocata raman cantonate la nivelul zonei de inoculare.

7. La testele de migrare "in tissue" utilizandu-se modelul "organotypic brain slices" s-a observat ca celulele de glioblastom HTB14 (U87) transfectate cu shRNA pentru SNAI2 si pentru gena proteinei fluorescente verzi (GFP) au manifestat in sectiunile tisulare cerebrale o scadere semnificativa atat a viabilitatii cat si a capacitatii de migrare comparativ cu celulele de de glioblastom HTB14 de control.

8. Aceste rezultate demonstreaza faptul ca gena Lis1 si gena Snai2 au un rol esential in migrarea si respectiv in proliferarea celulelor de glioblastom si ca reprezinta potentiale tinte terapeutice. Astfel, obiectivul principal al proiectului, de a identifica noi gene implicate in migrarea si proliferarea glioblastomului, ca punct de plecare pentru dezvoltarea unor viitoare terapii moleculare a fost indeplinit.

Diseminare rezultate

Rezultatele proiectului au contribuit la prezentarea si publicarea urmatoarelor lucrari:

1. Nestin expression in biopsy samples correlates with the invasive phenotype of cerebral gliomas. F. M. Brehar, D. Arsene, M. Lisievici, M. R. Gorgan. Prezentare orala. 9th CONGRESS of the RSN with International Participation, 19-21 Septembrie, 2013, Bucuresti, Romania.

2. Glioma stem cells specifically induce infiltrative growth pattern xenografts. F. M. Brehar, R.M. Gorgan, C. Bleotu, O. Zarnescu. Prezentare poster. EANS Annual Meeting 2013, 11-14 Noiembrie 2013, Tel Aviv, Israel.

3. GFAP-δ and Nestin as Molecular Markers related to the Cell Origins and Invasion in Human Gliomas, F. M. Brehar, M. R. Gorgan. Prezentare orala la 3rd Congress in the Danube-Carpathian Region Joint Meeting with Southeast European Neurosurgical Society(SeENS). Abstract publicat in J NEUROL SURG A CENT EUR NEUROSURG 2014; 75 - o009, DOI: 10.1055/s-0034-1382170 (**Revista indexata ISI, factor de impact 2013: 0.493**).

4. Immunohistochemical analysis of GFAP-δ and nestin in cerebral astrocytomas. Brehar FM, Arsene D, Brinduse LA, Gorgan MR. **Articol in extenso** publicat in Brain Tumor Pathol. 2015 Apr;32(2):90-8 (**revista indexata ISI, factor de impact 2015: 1,23**).

5. Current perspectives concerning the multimodal therapy in Glioblastoma. Florina Grigore, Felix Mircea Brehar, Mircea Radu Gorgan. **Articol in extenso** publicat in Romanian Neurosurgery (2015) XXIX (XXII) 1: 3 – 19. Revista categoria B.

6. Pros and cons factors of microsurgery in the management of reccurent glioblastomas. Felix Mircea Brehar, Mircea Radu Gorgan. Poster presentation, Congress of Neurological Surgeons, 2015 Annual Meeting, September 26-30, New Orleans, USA.

7. Silencing the Lis1 gene inhibits the self-renewal and invasion of glioblastoma CD133+ cells. Felix Mircea Brehar, Anca Violeta Gafencu, Violeta Georgeta Trusca, Mirela Amaireh, Mara Baez Silvia Elena, Mircea Radu Gorgan. Prezentare orala. The 42nd Congress of the Romanian Society of Neurosurgery, 15-17 Septembrie, 2016, Cluj-Napoca, Romania

8. Lis1 is preferentially expressed in glioblastoma CD133+ cells and regulates the self-renewal and migration of U87 CD133+ cells. F. M. Brehar. A. V. Gafencu, D. Arsene, V. G. Trusca, E. V. Fuior, S. E. Mara Baez Rodriguez, M. Amaireh and M. R. Gorgan. Prezentare poster. 12th Meeting of the European Association of Neuro-Oncology, Mannheim/Heidelberg, Germany, October 12-16, 2016. Abstract publicat in Neuro Oncol (2016) 18 (suppl 4): iv42. doi: 10.1093/neuonc/now188.144 (**Revista indexata ISI, factor de impact 2016: 7,37**)

9. **Monografie.** Neurochirugia stereotactica, Felix Brehar, Mircea Gorgan, Editura Medicala, 2014, Bucuresti, ISBN: 978-973-39-0767-1

10. **Monografie.** Ghid de patologie tumorala neurochirurgicala, Prof. Mircea Gorgan, Dr. F. Brehar, Editura Medicala, 2014, ISBN: 978-973-39-0777-0

11. **Monografie.** Experimental models in glioblastoma research, Felix Brehar, Mircea Gorgan, Nova Science Publishers,Inc, New York, USA, 2015, ISBN: 978-1-63482-535-1 (**Editura indexata ISI**).

Activitate 2.2. Redactarea raportului final

Bibliografie

1. Mark S. Greenberg, Handbook of Neurosurgery. Seventh edition. New York: Thieme Medical Publisher; 2010

2. Paul Kleihues, Webster Cavenee, Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System, World Health Organization (WHO) Classification of Tumors, Lyon: IARC Press; 2000

3. Paola Perego, Amerigo Boiardi, Nives Carenini, Michelandrea De Cesare, Ersilia Dolfini, Roberto Giardini, Ivana Magnani5, Stefania Martignone, Antonio Silvani, Carla Soranzo and Franco Zunino. Characterization of an established human, malignant, glioblastoma cell line (GBM) and its response to conventional drugs, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 1994

4. Pontén, J., Macintyre, E. H. (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. Acta Pathol Microbiol Scand A. 74, 465-486.

5. Beadle C, Assanah MC, Monzo P, Vallee R, Rosenfeld SS, and Canoll P. The Role of Myosin II in Glioma Invasion of the Brain. Molecular Biology of the Cell 2008; 19:3357–3368

6. Ivkovic S, Beadle C, Noticewala S, Massey SC, Swanson KR, Toro LN, Bresnick AR, Canoll P, and Rosenfeld SS. Direct Inhibition Of Myosin II Effectively Blocks Glioma Invasion In The Presence Of Multiple Motogen. Mol Biol Cell. 2012; 23(4):533-42

7. Elias MC, Tozer KR, Silber JR, Mikheeva S, Deng M, Morrison RS, Manning TC, Silbergeld DL, Glackin CA, Reh TA, Rostomily RC: TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. Neoplasia 2005, 7:824-837

8. Svetlana A Mikheeva, Andrei M Mikheev, Audrey Petit, Richard Beyer, Robert G Oxford, Leila Khorasani, John-Patrick Maxwell, Carlotta A Glackin, Hiroaki Wakimoto, Inés González-Herrer, Isidro Sánchez-García, John R Silber, Robert C Rostomily, TWIST1 promotes invasion through mesenchymal change in human glioblastoma, Molecular Cancer 2010, 9:194

9. Henry LR, Lee HO, Lee JS, Klein-Szanto A, Watts P, Ross EA, Chen WT, Cheng JD: Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. Clin Cancer Res 2007, 13:1736-1741.

10. Scrideli CA, Carlotti CG Jr, Okamoto OK, Andrade VS, Cortez MA, Motta FJ, Lucio-Eterovic AK, Neder L, Rosemberg S, Oba-Shinjo SM, Marie SK, Tone LG: Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. J Neurooncol 2008, 88:281-291.

11. Ren Liu, Bo Tian, Marla Gearing, Stephen Hunter, Keqiang Ye, and Zixu Mao, Cdk5-mediated regulation of the PIKE-A-Akt pathway and glioblastoma cell invasion, PNAS, 27, 2008, 105; 21: 7570–7575

12. Takanori Ohnishi, Hirotaka Matsumura, Shuichi Izumoto, et al., A Novel Model of Glioma Cell Invasion Using Organotypic Brain Slice Culture, Cancer Res 1998;58:2935-2940

13. Hong Wei Yang, Lata G Menon, Peter M Black, Rona S Carroll and Mark D Johnson, SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas, BMC Cancer 2010, 10:301

14. Satoshi O. Suzuki, Richard J. McKenney, Shin-ya Mawatari, Masashi Mizuguchi, Atsushi Mikami, Toru Iwaki, James E. Goldman, Peter Canoll, Richard B. Vallee, Expression patterns of LIS1, dynein and their interaction partners dynactin, NudE, NudEL and NudC in human gliomas suggest roles in invasion and proliferation, Acta Neuropathol (2007) 113:591–599

15. LAN Bao-Jin， LU Wen-Jing， LAN Feng， CAO Cui-Li， GE Rui-Min， CHEN Ling-Long， ZHANG Xiao-Yan， LU Ai-Li， WU Bi-Lian， MA Xiao-Wen， SHEN Li, Silencing of Nestin Promotes Glioma Cell Migration and Proliferation through Activation of Cyclin-dependent Kinase 5, Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 27(5) :419-425, 2011.

16. Ren Liu, Bo Tian, Marla Gearing, Stephen Hunter, Keqiang Ye, and Zixu Mao, Cdk5-mediated regulation of the PIKE-A-Akt pathway and glioblastoma cell invasion, PNAS, May 27, 2008, vol. 105, no. 21, 7570–7575.

17. Brehar FM, Arsene D, Brinduse LA, Gorgan MR, Immunohistochemical analysis of GFAP-δ and nestin in cerebral astrocytomas, BRAIN TUMOR PATHOL. 2014 Sep 2.

Data: 30.11.2016

Director de proiect,

Dr Felix Mircea Brehar